

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAIO PIANA PEREIRA

**Digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas  
contendo óleo de babaçu e determinação de bioacessibilidade de  
quercetina encapsulada**

---

Pirassununga

2015

CAIO PIANTA PEREIRA

**Digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas  
contendo óleo de babaçu e determinação de bioacessibilidade de  
quercetina encapsulada**

***Versão Corrigida***

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Samantha Cristina de Pinho

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo

Pereira, Caio Pianta  
P436d Digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas  
sólidas contendo óleo de babaçu e determinação de  
bioacessibilidade de quercetina encapsulada / Caio  
Pianta Pereira. -- Pirassununga, 2015.  
107 f.  
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e  
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.  
Departamento de Engenharia de Alimentos.  
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de  
Alimentos.  
Orientadora: Profa. Dra. Samantha Cristina de Pinho.

1. Sistemas de microencapsulação 2. Partículas  
lipídicas sólidas 3. Digestibilidade 4. Óleo de babaçu  
5. Triestearina. I. Título.

*“É mais fácil conseguir o que se deseja com um sorriso do que com a ponta da espada.” (William Shakespeare)*

*Aos meus pais e irmã, que me incentivaram a estudar para a construção de um futuro.  
Aos meus amigos, que me apoiaram em momentos difíceis e me ajudaram a chegar até aqui.  
A Deus, que orienta nossos caminhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me auxiliar com força, orientação, proteção e amor.

Aos meus pais, pelo apoio em momentos difíceis, motivação e incentivo.

À minha irmã, pelo carinho, companheirismo e estímulo.

À Prof<sup>a</sup>. Samantha C. de Pinho, pela orientação, ensinamentos e paciência.

Ao Diretor da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Prof. Dr. Paulo Sobral, pelos ensinamentos, paciência, críticas e recomendações necessárias.

Às alunas de graduação Camila Garcia Jange e Camila Cazado, pelo auxílio na realização dos experimentos.

Às companheiras de laboratório, doutorandas e amigas Taíse Toniazzo e Graziela Veiga pelo companheirismo, aprendizado, incentivo, motivação e paciência.

Aos companheiros de laboratório Guilherme Silva, Marília Moraes, Ivana Andrade, Thais Borrin, Carolina Serna, Camila Molina, Nayla Souki, Grazielle Bovi, Juliana Gobbi, Matheus Chaves, Eduarda Lopes, Marlucci Ghiraldi e Marina Peres pelos momentos compartilhados e auxílio nos procedimentos.

Aos especialistas de laboratório Ana Mônica Bittante pelas análises de calorimetria diferencial de varredura e ao Marcelo Tomazini pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais e análises de microscopia ótica.

Aos técnicos de laboratório Ednelí Monterrey, Carla Alves Monaco, Fabio Gallo, Keila Aracava e Tatiana Sanches pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Ao Prof. Gelson Andrade por auxiliar na compreensão dos conhecimentos de química e bioquímica.

Às funcionárias e amigas Silvana Pagotto e Renata Zuccherelli pelos anos de companheirismo, críticas e cafés.

À minha tia Claudete Henriques, por ter me incentivado a iniciar o curso de mestrado.

Aos meus familiares, por sempre me acolherem nos momentos difíceis.

Às minhas amigas Raíssa Bertoncello e Sarah Nikka Rodrigues, pelos anos de companheirismo, grande amizade, dedicação e sempre me fazer companhia nestes anos em Pirassununga.

Ao meu amigo e Dr. Marcelo Riêra, pelos anos de amizade, cuidado, acolhimento, moradia, paciência e estímulo.

Aos meus amigos de Votuporanga e Ribeirão Preto, por sempre me divertirem, me ouvirem e aconselharem.

Ao Grupo Vocal Patuscada, por me proporcionar momentos de relaxamento e diversão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos financiamentos concedidos (Processo 2012/21010-1 - bolsa de Mestrado e Processo 2012/23328-9 – financiamento do projeto de pesquisa).

À Danisco, pela doação da goma xantana.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, pela formação e acolhimento durante estes anos de trabalho.

## RESUMO

PEREIRA, C.P. **Digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de babaçu e determinação de bioacessibilidade de quercetina encapsulada.** 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O estilo de vida contemporâneo tem aumentado a demanda por produtos alimentícios que proporcionem benefícios à saúde como os alimentos funcionais. Entretanto, a incorporação de diversos compostos bioativos nas matrizes alimentícias é dificultada pela característica hidrofóbica da maioria destes compostos, que também desfavorece a absorção no intestino. Este é o caso de muitos flavonoides como a quercetina, e sistemas de encapsulação como as micropartículas lipídicas sólidas são capazes de diminuir estes problemas. O presente trabalho de Mestrado teve como objetivo avaliar a digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de babaçu como fonte de triacilgliceróis de cadeia média (MCTs) e triestearina, e a bioacessibilidade da quercetina encapsulada nestes sistemas lipídicos. Foram produzidas dispersões variando-se a concentração de tensoativo (de 2,0 a 4,0%) e de óleo de babaçu (1,2, 2,0 e 2,8%). Os sistemas produzidos apresentaram diâmetro médio que variou de 700 nm a 1800 nm para as diferentes formulações e estabilidade físico-química durante 30 dias. Os resultados obtidos nos ensaios de digestibilidade *in vitro* indicam uma maior tendência de desestabilização dos sistemas produzidos com mais óleo de babaçu na fase gástrica. O resultado da hidrólise dos triacilgliceróis mostrou que 30% de ácidos graxos foram liberados na fase intestinal, independente da formulação de micropartículas lipídicas. Os resultados de bioacessibilidade indicaram que em baixas concentrações de tensoativo há influência da concentração de triacilgliceróis de cadeia média nas formulações e os resultados mais altos foram obtidos para as partículas contendo 2,8% de óleo de babaçu e 2,0% de tensoativo. Desta forma, pode-se concluir que os sistemas produzidos neste trabalho foram eficientes para preservação da quercetina, o que possibilita sua incorporação em sistemas alimentícios e também aumentou a bioacessibilidade deste bioativo.

Palavras-chave: sistemas de microencapsulação, partículas lipídicas sólidas, digestibilidade, óleo de babaçu, triestearina.

## ABSTRACT

PEREIRA, C.P. ***In vitro* digestibility of solid lipid microparticles containing babacu oil and determination of bioaccessibility of quercetin encapsulated.** 2015. 107 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Contemporary lifestyle has increased the demand for food products that provide health benefits as functional foods. However, the incorporation of bioactive compounds in food matrices is hampered by hydrophobic character of the majority of these compounds which also difficult the absorption in the intestine. This is the case of many flavonoids such as quercetin which has reduced bioactivity in plants. Encapsulation systems such as solid lipid microparticles are capable of solving these problems. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* digestibility of solid lipid microparticles produced with babassu oil as a source of medium chain triacylglycerols (MCTs) and tristearin, besides the bioaccessibility of quercetin encapsulated in these lipid systems. Dispersions were produced by varying the surfactant (2.0 to 4.0%) and MCT (1.2, 2.0 and 2.8%) concentrations. The systems produced showed an average diameter ranging from 700 nm to 1800 nm for different formulations and colloidal stability for 30 days. The results obtained in the *in vitro* digestibility assays indicate a higher tendency to destabilization in gastric phase of the systems produced with more babassu oil. 30% of fatty acids were released in the intestinal phase for all formulations. The results indicated that bioaccessibility at low surfactant concentrations has the influence of the concentration of MCT in formulations. The highest results were obtained for particles containing 2.8% of babassu oil and 2.0% of surfactant. Thus, we can conclude that the systems produced in this work were efficient for preservation of quercetin, which allows its incorporation in food systems and also increased the bioaccessibility of this bioactive.

Keywords: microencapsulation systems, solid lipid particles, digestibility, babassu oil, tristearin.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Exemplos de estudos empregando partículas lipídicas sólidas para encapsulação de bioativos de interesse na área alimentícia. ....	10
Tabela 2.2. Perfil de ácidos graxo do óleo de babaçu .....	17
Tabela 4.1. Temperatura de fusão e sigla dos lipídios utilizados para a produção das micropartículas lipídicas sólidas .....	26
Tabela 4.2. Dados sobre os tensoativos utilizados na produção das micropartículas lipídicas sólidas .....	27
Tabela 4.3. Formulações empregadas na produção das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina .....	29
Tabela 4.4. Composição da solução de eletrólitos utilizada na fase gástrica .....	32
Tabela 4.5. Composição da solução de eletrólitos utilizada na fase gástrica .....	32
Tabela 5.1. Resultados de estabilidade da quercetina encapsulada nas partículas lipídicas sólidas quanto à concentração de bioativo.....	40
Tabela 5.2. Resultados de estabilidade da quercetina encapsulada nas partículas lipídicas sólidas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio. ....	47
Tabela 5.3. Resultados e análise estatística para potencial zeta das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina contendo 4,0% de tensoativo na formulação durante 90 dias de armazenamento.....	51
Tabela 5.5. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das partículas lipídicas sólidas contendo óleo de babaçu e triestearina com quercetina encapsulada.....	53
Tabela 5.5. Atividades enzimáticas determinadas para a pepsina.....	56
Tabela 5.6. Atividades enzimáticas determinadas para a lipase pancreática. ....	57
Tabela 5.7. Atividades enzimáticas determinadas para a pancreatina .....	57
Tabela 5.8. Resultados de diâmetro hidrodinâmico médio para digestibilidade <i>in vitro</i> simulada das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina. ....	60
Tabela 5.9. Resultados de potencial zeta para ensaios de digestibilidade <i>in vitro</i> simulada das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina. ....	63
Tabela 5.10. Resultados médios de liberação de ácidos graxos e resultados da análise estatística.....	72
Tabela 5.11. Resultados de bioacessibilidade da quercetina microencapsulada em partículas lipídicas sólidas contendo OB.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura da quercetina. (Fonte: PISKULA et al., 2012).....	3
Figura 2.2. Efeitos potenciais da utilização de lipídios utilizados em sistemas de microencapsulação na absorção de bioativos.....	7
Figura 2.3. Exemplos de sistemas de entrega lipídicos que podem ser utilizados para controlar a digestão lipídica e a liberação de ativos hidrofóbicos.....	8
Figura 2.4. Esquema simplificado de uma partícula lipídica sólida .....	11
Figura 2.5. (a) Estrutura cristalina perfeita das partículas produzidas com somente um tipo de lipídio sólido; (b) estrutura com imperfeições das partículas produzidas com mais de um tipo de lipídio .....	12
Figura 2.6. Palmeira, fruto e óleo extraído das sementes do babaçu. ....	17
Figura 2.7. Processos físico-químicos e fisiológicos do trato gastrointestinal humano. ....	19
Figura 5.1. Aspecto visual da dispersão de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de babaçu e triestearina, encapsulando quercetina. ....	37
Figura 5.2. Aspecto das disperses produzidas com 1,0% (a) e 1,5% (b) de tensoativo. ....	38
Figura 5.3. Perfis temporais de concentração de quercetina encapsulada nas micropartículas lipídicas sólidas durante 30 dias de armazenamento: (a) 1,2% de óleo de babaçu; (b) 2,0% de óleo de babaçu; (c) 2,8% de óleo de babaçu. ....	41
Figura 5.4. Resultados de estabilidade quanto à distribuição de tamanho de partícula para as formulações contendo 2% de tensoativo e 1,2% (a), 2,0% (b) e 2,8% (c) de óleo de babaçu.....	45
Figura 5.5. Perfis temporais de diâmetro hidrodinâmico médio das micropartículas lipídicas sólidas durante 30 dias de armazenamento: (a) 1,2% de óleo de babaçu; (b) 2,0% de óleo de babaçu; (c) 2,8% de óleo de babaçu. ....	49
Figura 5.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas com 1,2% de óleo de babaçu e 4% de tensoativo .....	53
Figura 5.7. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura. ....	54
Figura 5.8. Imagens de microscopia ótica das fases da simulação da digestibilidade <i>in vitro</i> das partículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina contendo 1,2% de óleo de babaçu .....	66

Figura 5.9. Imagens de microscopia ótica das fases da simulação da digestibilidade <i>in vitro</i> das partículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina contendo 2,0% de óleo de babaçu .....	67
Figura 5.10. Imagens de microscopia ótica das fases da simulação da digestibilidade <i>in vitro</i> das partículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina contendo 2,8% de óleo de babaçu. ....	68
Figura 5.12. Perfis de variação do pH durante a fase intestinal dos ensaios de digestibilidade <i>in vitro</i> .....	70
Figura 5.13. Perfis de liberação de ácidos graxos durante a fase duodenal dos ensaios de digestibilidade <i>in vitro</i> .....	71

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DMSO - dimetilsulfóxido

DRX – difratometria de raios-X

DSC – *differential scanning calorimetry* (calorimetria diferencial de varredura)

EHL – equilíbrio hidrofílico lipofílico

FG – fase gástrica

FGS – fluido gástrico simulado

FI – fase intestinal

FIS – fluido intestinal simulado

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MCT – *medium chain triglycerides* (ácidos graxos de cadeia média)

MLS – micropartículas lipídicas sólidas

OB – óleo de babaçu

PS60 – polissorbato 60 (Tween 60)

SP80 – éster de monooleato de sorbitan (Span 80)

TAG – triacilglicerol

TGI – trato gastrointestinal

TS – triestearina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. QUERCETINA: ESTRUTURA, PROPRIEDADES FUNCIONAIS E BIOACESSIBILIDADE .....	3
2.2. SISTEMAS LIPÍDICOS DE MICROENCAPSULAÇÃO.....	6
2.3. TRIACILGLICEROIS DE CADEIA MÉDIA E ÓLEOS LÁURICOS.....	15
2.3.1. Óleo de Babaçu .....	16
2.4. DIGESTIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS ENCAPSULADOS EM SISTEMAS LIPÍDICOS DE MICROENCAPSULAÇÃO .....	18
2.5. MODELOS PARA ESTUDO DE DIGESTIBILIDADE E BIOACESSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> .....	20
3. Objetivos.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. MATERIAIS .....	26
4.1.1. Produção das micropartículas lipídicas sólidas.....	26
4.1.2. Caracterização das micropartículas lipídicas sólidas .....	27
4.1.3. Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina .....	27
4.2. MÉTODOS .....	28
4.2.1. Produção das micropartículas lipídicas sólidas.....	28
4.2.2. Caracterização e estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas	29
4.2.2.1. Eficiência de encapsulação da quercetina .....	29
4.2.2.2. Quantificação de quercetina encapsulada .....	30
4.2.2.3. Determinação de distribuição de tamanho, diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta das micropartículas.....	30

4.2.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	31
4.2.2.5. Determinação do comportamento térmico das micropartículas por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	31
4.2.3. Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina .....	31
4.2.3.1. Determinação das atividades das enzimas utilizadas .....	31
4.2.3.2. Preparação dos fluidos simulados utilizados nos ensaios de digestibilidade <i>in vitro</i> .....	32
4.2.3.3. Ensaios de digestibilidade <i>in vitro</i> pH stat.....	33
4.2.3.4. Quantificação da liberação de ácidos graxos durante a digestão <i>in vitro</i> simulada .....	34
4.2.3.5. Monitoramento das modificações das micropartículas durante a digestão <i>in vitro</i> simulada .....	34
4.2.4. Avaliação da bioacessibilidade da quercetina microencapsulada...	35
4.2.5. Análise estatística dos dados.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE QUERCETINA A SER ENCAPSULADA NAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	36
5.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ENCAPSULANDO QUERCETINA, AO LONGO DO TEMPO DE ARMAZENAGEM.....	38
5.2.1. Concentração de quercetina encapsulada, diâmetro hidrodinâmico médio, distribuição de tamanho e potencial zeta. ....	38
5.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	52
5.2.3. Comportamento térmico.....	53
5.3. AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ENCAPSULANDO QUERCETINA...	55
5.3.1. Determinação das atividades das enzimas utilizadas e preparação das soluções enzimáticas e biliar.....	55

5.3.2. Monitoramento das modificações das micropartículas lipídicas durante a digestão <i>in vitro</i> simulada.....	58
5.3.3. Liberação de ácidos graxos durante a digestão <i>in vitro</i> simulada e determinação da bioacessibilidade da quercetina encapsulada .....	69
6. CONCLUSÕES .....	76
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por um estilo de vida mais saudável tem se intensificado nos últimos anos como resposta das pessoas à vida contemporânea. Relacionada diretamente à construção deste estilo de vida saudável está a alimentação. Os alimentos funcionais surgiram como forma de suprir essa demanda a partir do desenvolvimento tecnológico de produtos que possuam propriedades que tragam benefícios à saúde além daquelas nutricionalmente presentes. Estes produtos são desenvolvidos comumente pela incorporação de compostos que proporcionam esses benefícios, os bioativos, em sistemas alimentícios. Entretanto, muitos destes compostos são de difícil aplicação uma vez que possuem relativa hidrofobicidade e baixa biodisponibilidade. Essa dificuldade gera a necessidade de investigação de como agregar eficientemente estes compostos a uma formulação e torná-lo disponível para absorção pelo organismo.

Os flavonoides têm se destacado dentre os compostos bioativos devido à principalmente suas propriedades antioxidantes e a quercetina é um exemplo que tem chamado atenção de pesquisadores uma vez que pode ser facilmente extraída de vegetais.

Existe uma variedade de sistemas que são capazes de aumentar a absorção de compostos bioativos hidrofóbicos e facilitam a sua incorporação em matrizes alimentícias. Dentre eles, os sistemas de microencapsulação tem se mostrado como alternativa viável por demonstrarem efeitos positivos no aumento da biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade quando comparados aos bioativos isolados. Sistemas de microencapsulação que utilizam lipídios em sua formulação ainda demonstram efeitos mais positivos quanto à absorção, devido aos efeitos do meio lipídico nas interações que ocorrem no trato gastrointestinal, pois estes melhoram a absorção de moléculas lipofílicas, a dissolução das mesmas, a permeabilidade intestinal e o tempo de residência gastrointestinal. As micropartículas lipídicas sólidas são bons exemplos destes sistemas coloidais e são produzidas tipicamente com uma mistura de lipídios sólidos e líquidos. A utilização de diferentes tipos de lipídios em uma mesma formulação como triacilgliceróis de cadeia média e longa podem afetar a forma que o sistema será absorvido. Todavia, a compreensão do comportamento das partículas e as mudanças que ocorrem no trato gastrointestinal após a sua ingestão ainda estão distantes de serem plenamente compreendidas, mesmo porque cada sistema

lipídico, a partir do momento em que se encontra no ambiente gastrointestinal, pode apresentar comportamentos distintos, dependentes de sua composição e da matriz alimentícia em que está inserido.

Os modelos de simulação do trato gastrointestinal *in vitro* têm sido usados amplamente nos estudos de digestibilidade, avaliação da biodisponibilidade e absorção de componentes alimentícios por fornecerem bons resultados rapidamente. Além disso, também podem servir como ferramentas para triagem de alimentos e sistemas de entrega com diferentes composições e estruturas. Estes modelos têm sido utilizados para tentar prever o comportamento *in vivo* da absorção de nutrientes. Entretanto, apesar de existir uma grande diversidade de protocolos experimentais que podem ser empregados já descritos na literatura, ainda existe uma enorme falta de consenso sobre o melhor protocolo para sistemas lipídicos emulsionados.

Objetivando-se suprir a necessidade de inovação científica nos aspectos citados acima, neste trabalho foi proposta a avaliação da digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de babaçu e triestearina, além da bioacessibilidade da quercetina encapsulada nestes sistemas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. QUERCETINA: ESTRUTURA, PROPRIEDADES FUNCIONAIS E BIOACESSIBILIDADE

Dentre os diversos bioativos estudados na área de alimentos, os flavonoides tem se destacado devido aos efeitos benéficos que eles têm sobre a saúde humana. Os flavonoides podem ser classificados em flavonois, flavonas, flavanonas, flavan-3-óis, flavan-3,4-dióis, etc. (XU, 2014).

Os flavonois são o subgrupo de flavonoides mais extensivamente estudados, e estão presentes em uma grande diversidade de alimentos (HOLLMAN; KATAN, 1999). Dentre eles, a quercetina é um dos mais abundantes, e está presente em frutas e vegetais (maçã, pêra, ameixa, uva, alface, morango, cebola, tomate, por exemplo) na sua forma glicosilada (PISKULA et al., 2012).

A quercetina, ou 3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxiilflavona, tem a fórmula molecular  $C_{15}H_{10}O_7$ , massa molar de 302,24 g/mol, e ponto de fusão 316 °C, e tem sua estrutura química representada na Figura 2.1. Em 2010, a *Food and Drug Administration* (FDA) concedeu à quercetina com uma pureza de 99,5% (QU995™) o status de *Generally Recognized as Safe* (GRAS). Devido a este fato, e também à possibilidade de incorporação em uma grande variedade de alimentos, especialmente em alimentos funcionais, faz com que a quercetina tenha atraído as atenções de cientistas de alimentos (XU, 2014). Entretanto, um dos problemas da incorporação da quercetina em formulações alimentícias reside na sua relativa hidrofobicidade ( $\log P = 1,99$ , de acordo com MCCLEMENTS, 2012), já que estas são usualmente de base aquosa.

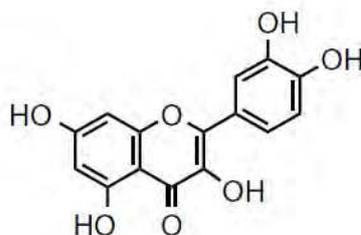


Figura 2.1. Estrutura da quercetina. (Fonte: PISKULA et al., 2012).

Seus efeitos benéficos para a saúde estão relacionados com sua capacidade antioxidante e, portanto, são a esta molécula atribuídos efeitos antitumoral, antiinflamatório, anticancerígeno e hepatoprotetivo (XU, 2014; LANDI-LIBRANDI et al., 2012; GHOSH et al., 2011; WONG; CHIU, 2011; WU et al., 2008; YUAN et al., 2006; KANADASWAMI et al., 2005). Todavia, por ser uma molécula lipofílica, a quercetina possui baixa bioatividade *in vivo* devido a várias razões como sua baixa absorção no intestino, ser altamente metabolizada ou rapidamente eliminada antes de ser disponibilizada na circulação sistêmica (XU, 2014).

O termo biodisponibilidade é utilizado para indicar a proporção de bioativo que passa para a circulação sistêmica após a administração oral, levando-se em conta tanto a absorção quanto a degradação metabólica local (DAHANE; HOFFMAN, 2008; RANG; DALE; RITTER, 2001). A biodisponibilidade oral é influenciada por três fatores: pela fração do componente lipofílico liberado da matriz dos alimentos aos sucos do trato gastrointestinal para se tornar bioacessível, da fração do componente liberado que é transportado através do epitélio intestinal, e da fração do componente absorvido que atinge a circulação sistêmica sem ser biotransformado. A principal finalidade da utilização de sistemas de entrega de bioativos é aumentar a sua biodisponibilidade global ao aumentar a bioacessibilidade (XU, 2014; MCCLEMENTS; DEC; CJM, 2004).

A quercetina, por ser lipofílica, deve ser preferencialmente liberada da matriz em que se encontra, para então ser incorporada em micelas mistas que estão presentes no intestino delgado, para que somente então possa ser absorvida. Estas micelas mistas contêm sais biliares e fosfolípidios secretados pelo fígado, além de produtos da digestão de lípidios: monoacilgliceróis e ácidos graxos livres. Por isso, a solubilização determina a fração de bioativo que é bioacessível (XU, 2014).

Para que a bioacessibilidade da quercetina possa ser aumentada, pode-se empregar técnicas de microencapsulação, que produzirão sistemas de entrega capazes de aumentar a incorporação de flavonoides nas micelas mistas. Dentre tais técnicas, pode-se citar a incorporação em ciclodextrinas, lipossomas, emulsões, nanoemulsões e partículas lipídicas sólidas (XU, 2014; YANG et al., 2012; WONG; CHIU, 2011; DORA et al., 2011; TAN et al., 2011; LEONARDUZZI et al., 2010; LI et al., 2009; ALEXOPOLOU et al., 2006; YUAN et al., 2006). Sistemas de microencapsulação coloidais baseados em matrizes lipídicas são especialmente

interessantes para alcançar ambos os objetivos, facilitar a incorporação em matrizes alimentícias e aumentar a biodisponibilidade da quercetina. Existem, entretanto, poucos trabalhos na literatura utilizando esta abordagem de microencapsulação, e dentre estes trabalhos, poucos relacionados com o estudo da digestibilidade de tais sistemas, visando especificamente à incorporação de quercetina encapsulada em formulações alimentícias.

Pool et al. (2012) desenvolveram um sistema de entrega de quercetina por encapsulação em partículas poliméricas (utilizando polímero Eudragit®) e conseguiram um aumento significativo da bioacessibilidade do bioativo e estabilidade de 6 meses das partículas, sem perda das propriedades antioxidantes.

Em outro estudo feito também por Pool et al. (2013), foi desenvolvido um sistema de entrega baseado em nanoemulsões para aumentar a bioacessibilidade da quercetina utilizando triacilglicerois de cadeia média (MCT, na forma do óleo Mygliol 812®). O sistema produzido permitiu uma maior incorporação da quercetina na fase micelar após digestão *in vitro* simulando o intestino delgado quando comparado à simples dispersão do bioativo em óleo ou água pura, comprovando o aumento na bioacessibilidade.

Por sua vez, Adytia et al. (2013) obtiveram dados em um estudo que revelou que o estado físico dos lipídios e a composição dos materiais utilizados para formulação de sistemas lipídicos de entrega podem alterar a bioacessibilidade da quercetina. Foram testados nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, *solid lipid nanoparticles*), nanocarreadores lipídicos (NLC, *nanostructured lipid carriers*), e nanoemulsões para encapsulação. SLNs são produzidas utilizando lipídios que são sólidos à temperatura ambiente e corporal. Se ao invés de lipídios sólidos, forem utilizados lipídios líquidos, o resultado são as emulsões. Entretanto, se uma mistura de lipídios líquidos e sólidos é utilizada, há a formação dos NLC (MÜLLER et al., 2000; MÜLLER et al., 2002). No estudo realizado por Adytia et al. (2013), os valores de bioacessibilidade foram maiores para os nanocarreadores lipídicos e para as nanoemulsões (60%) quando comparados às nanopartículas lipídicas sólidas (35%) e dispersão de quercetina livre (7%).

## 2.2. SISTEMAS LIPÍDICOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

Segundo Rang, Dale & Ritter (2001), a natureza química de um composto tem efeito sobre as características de absorção no trato gastrointestinal humano. Em particular, a capacidade de atravessar barreiras hidrofóbicas de difusão é fortemente determinada pela lipossolubilidade. Com o conhecimento desta característica, é possível prever muitas propriedades como velocidade de absorção pelo intestino, penetração no cérebro e outros tecidos, bem como da extensão da eliminação renal.

Moléculas lipofílicas, que apresentam baixa solubilidade em água, frequentemente apresentam baixa biodisponibilidade oral e conseqüentemente podem perder grande parte de sua atividade biológica devido a tal limitação. É possível, entretanto, conseguir uma melhora significativa na absorção de tais moléculas se a dissolução, a permeabilidade intestinal, a estimulação do transporte linfático e o tempo de residência gástrica forem aumentados/estimulados, ou através da redução da atividade dos transportadores intestinais de efluxo e a bomba de efluxo de P-glicoproteína, bem como o metabolismo nos enterócitos (DAHAN; HOFFMAN, 2008; JEONG; PARK; PARK, 2007; PORTER et al., 2007; WASAN, 2007). Dentre os sistemas capazes de realizar tais tarefas estão os sistemas de microencapsulação lipídicos ou *lipid-based delivery systems* e o mecanismo de melhora da biodisponibilidade de compostos bioativos que está representado na Figura 2.2.

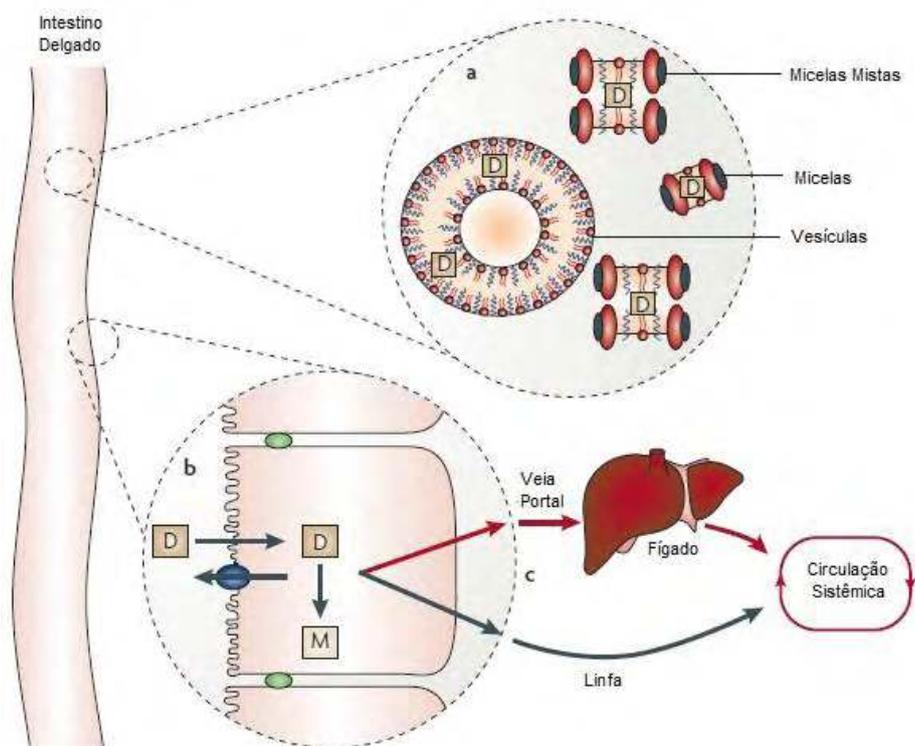


Figura 2.2. Efeitos potenciais da utilização de lipídios utilizados em sistemas de microencapsulação na absorção de bioativos: os lipídios podem afetar a absorção dos compostos bioativos de três formas: aumentando a solubilização do bioativo no meio intestinal pela alteração da composição e características do ambiente coloidal como pela formação de vesículas, micelas e micelas mistas (a); modificando transportadores intestinais de efluxo, bem como a formação de metabólitos nos enterócitos(b); ou alterando a via de transporte do bioativo para a circulação sistêmica através do sistema linfático sem a necessidade de uma primeira passagem pelo fígado e, portanto, reduzindo o metabolismo de primeira passagem (c) (Fonte: PORTER et al., 2007).

Sistemas lipídicos de microencapsulação são, em sua maioria, sistemas de microencapsulação coloidais baseados em matrizes lipídicas, em sua grande maioria, e diversos coloides desta natureza têm sido desenvolvidos para aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia, incluindo emulsões, microemulsões, lipossomas, nanoemulsões, emulsões, emulsões multicamadas, emulsões múltiplas, sistemas auto-emulsificantes e dispersões semi-sólidas/ sólidas (MCCLEMENTS, 2012; WASAN, 2007). Estes sistemas são desenvolvidos de forma a encapsular e proteger, além de liberar controladamente compostos bioativos hidrofóbicos no intestino delgado (MCCLEMENTS, 2012; MCCLEMENTS; LI 2010; GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2006). A Figura 2.3 mostra esquematicamente

diversos sistemas lipídicos que podem ser utilizados para microencapsulação de ativos hidrofóbicos.

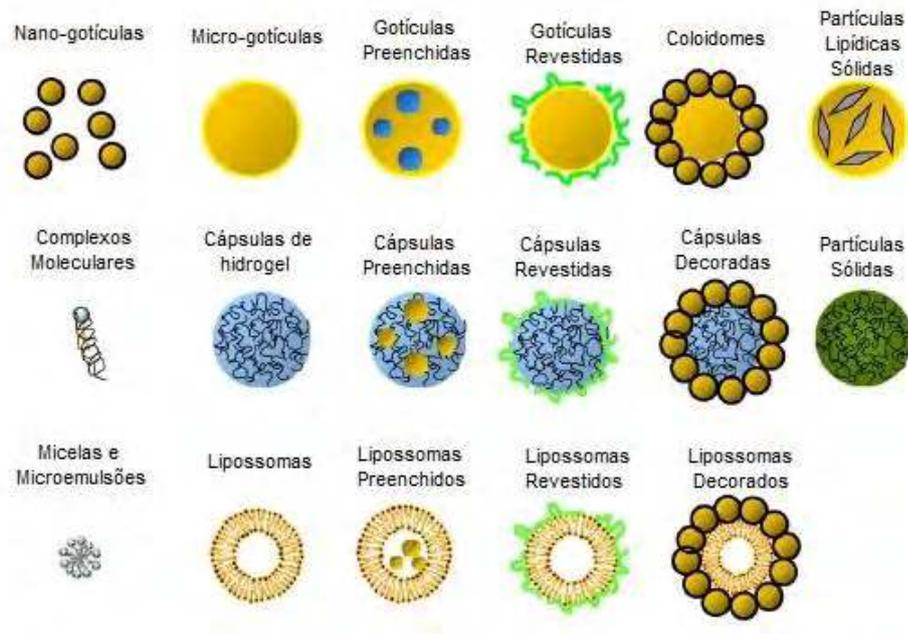


Figura 2.3. Exemplos de sistemas de entrega lipídicos que podem ser utilizados para controlar a digestão lipídica e a liberação de ativos hidrofóbicos (Fonte: MCCLEMENTS; LI, 2010).

A classe dos lipídios engloba os ácidos graxos, glicolipídios, lipoproteínas, fosfolipídios e esteróis. Estas substâncias são conhecidas por serem componentes básicos da estrutura celular, e servem como fonte de energia além de exercerem importantes funções biológicas. Como citado anteriormente, os lipídios podem ser utilizados como matrizes auxiliando no aumento da biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos. Os materiais lipídicos tipicamente utilizados incluem os ácidos graxos de cadeia média ou longa, mono, di e triacilgliceróis, em conjunto com tensoativos individuais ou misturados, além de solventes hidrofílicos e precisam ser escolhidos cuidadosamente quando utilizados para aplicações em sistemas de microencapsulação para entrega de bioativos (TEJESWARI et al., 2014; BREMMEL et al., 2013; PORTER et al., 2007; WASAN, 2007; POUTON, 2006).

Lipídios são normalmente classificados de acordo com sua estrutura química, polaridade, características e grau de interação com a água. Para administração oral, os lipídios podem ser divididos em digeríveis e não-digeríveis pelo trato gastrointestinal. Os lipídios digeríveis são compostos por lipídios

alimentícios como os glicerídeos, ácidos graxos, fosfolípidios, colesterol e ésteres de colesterol, assim como vários derivados sintéticos. A lipase pancreática hidrolisa os triacilglicerois produzindo monoacilglicerois e ácidos graxos. A presença dos produtos da hidrólise induz a secreção de bile e fluidos pancreáticos, causando uma mudança significativa no lúmen. Além disso, os produtos da digestão são mais hidrossolúveis que os lipídios complexos, e podem ser solubilizados nas micelas mistas formadas pelos sais de bile. Por outro lado, lipídios não-digeríveis incluem óleos minerais (parafina líquida) e poliésteres de sacarose. Quando administrados, permanecem no lúmen e podem diminuir a absorção do bioativo devido à retenção de parte destes compostos (TEJESWARI et al., 2014; MCCLEMENTS, 2012; MCCLEMENTS; LI, 2010; DAHAN; HOFFMAN, 2008; WASAN, 2007).

Várias combinações de lipídios e tensoativos têm mostrado propriedades de aumento da biodisponibilidade de bioativos, e esse aumento é dependente da formulação utilizada. Dependendo do tensoativo utilizado, pode haver a não-retenção do bioativo solubilizado dentro dos sistemas caso as concentrações utilizadas destes compostos estejam abaixo da concentração crítica para formação de micelas. Estes valores são geralmente altos para tensoativos de baixo peso molecular (TEJESWARI et al., 2014; PORTER et al., 2007; WASAN, 2007; POUTON, 2006). A produção de tais sistemas pode ser feita por diversas técnicas e incluem homogeneização a alta pressão, *spray drying*, misturadores de alto cisalhamento e ultrassom (MCCLEMENTS, 2012; JANNIN; MUSAKHANIAN; MARCHAUD, 2008; WASAN, 2007).

Dentre os sistemas lipídicos de encapsulação, as partículas lipídicas sólidas têm se mostrado como uma alternativa viável para substituição de outros sistemas como as emulsões e os lipossomas. Estudos para aplicação de partículas lipídicas sólidas para entrega de compostos bioativos hidrofóbicos podem ser encontrados na literatura, sendo alguns mostrados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Exemplos de estudos empregando partículas lipídicas sólidas para encapsulação de bioativos de interesse na área alimentícia (Fonte: adaptado de MOLINA, 2014).

Bioativo	Fase lipídica	Tensoativo(s)	Referência
β-caroteno	Tripalmitina	Tween 20	Helgason et al. (2009)
	Ácido esteárico, triestearina, trilaurina, ácido láurico	L-a-fosfatidilcolina e dipalmitoil fosfatidilcolina	Triplett II e Rathman (2009)
	Óleo de palmiste hidrogenado	WPI, Caseinato de sódio	Cornacchia e Roos (2011a), Cornacchia e Roos (2011b)
	Ácido esteárico e óleo de girassol	Tween 80	Gomes et al. (2013a)
	Triestearina e óleo de girassol	Lecitina de soja purificada e hidrogenada	Gomes et al. (2013b)
	Estearina de canola	Tween 80, Poloxamer 188	Malaki-Nik et al. (2012)
	N-hexadecil palmitato, gliceril estearato, óleo de semente de uva e esqualeno	Tween 80, Tween 20	Lacatusu et al. (2012)
β-caroteno + α-tocoferol	Ferulato estearílico	Tween 20	Trombino et al. (2009)
β-caroteno + tocois	Glicerídeos de óleo de palmiste hidrogenado	Span 40 and Tween 80	Hung et al. (2011)
Quercetina	Gliceril monoestearato	Lecitina de soja, Tween 80 e PEG 400	Li et al. (2009)
	Tristearina	PC soja hidrogenada	Scalia e Mezzena (2009)
	Mygliol 812N	β-lactoglobulina	Pool et al. (2013)
	Imwitor 900K	Tween 80, lecitina de soja, Span 20	Aditya et al. (2014)
	Gliceril monoestearato, glicerol monolaurato, triglicerídeos caprílicos e cápricos	Poliglicerol-10-laurato, poliglicerol-6-monoestearato e ésteres de sacarose-11	Ni et al. (2014)
Óleo essencial de <i>Artemisia arborescens</i> L.	Compritol 888	Pluronic F68	Lai et al. (2006)
Ômega-3 Luteína	Tripalmitina	Tween 20	Awad et al. (2009)
	Gliceril palmitoestearato,ác. palmítico, triglicerídeos caprílicos e cápricos, ácidos láurico, mirístico e esteárico	Pluronic F68	Liu e Wu (2010)
α-tocoferol	Óleo de palma	WPC	Shukat e Relkin (2011), Shukat et al. (2012)
Catalase	Tripalmitina	Poloxamer 188	Qi et al. (2012)
Coenzima Q10	Compritol 888	Poloxamer 188 e Tween 80	Gokce et al. (2012b)
Ergocalciferol	Tripalmitina	Tween 20	Patel e Martin-González (2012)
Nisina	Imwitor 900	Poloxamer 188 e deoxicolato de sódio	Prombutara et al. (2012)
Resveratrol	Compritol 888 and Mygliol 812	Poloxamer 188 e Tween 80	Gokce et al. (2012a)
Caseína hidrolizada	Manteiga de cupuaçu e ácido esteárico	Tween 80	Silva & Pinho (2013)

As partículas lipídicas sólidas são uma modificação das emulsões óleo em água (O/A), sendo que a diferença consiste na substituição do lipídio líquido (óleo) por um lipídio sólido ou uma mistura de lipídios sólidos à temperatura ambiente. Diferentes lipídios sólidos são utilizados para produção destas partículas como a tripalmitina, o álcool cetílico, o palmitato de cetila, o monoestearato de glicerila, a trimiristina, a triestearina e o ácido esteárico (DAS;CHAUDHURY, 2011; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000). Tais sistemas são adequados para encapsular compostos lipossolúveis, hidrofóbicos ou quimicamente instáveis. Os efeitos positivos do meio lipídico na absorção destes compostos pelo trato gastrointestinal são frequentemente relatados. Além disso, apresentam outras vantagens, como combinar características de outros sistemas carreadores, como das partículas lipídicas poliméricas (diferentes modificações químicas), lipossomas (permeabilidade da membrana), e emulsões (aumento da biodisponibilidade do ativo encapsulado) para oferecer estabilidade física, proteção a ativos sensíveis contra a degradação, liberação controlada e excelente tolerabilidade (WISSING; KAYSER; MULLER, 2004; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000). Uma representação esquemática das partículas sólidas pode ser vista na Figura 2.4.:

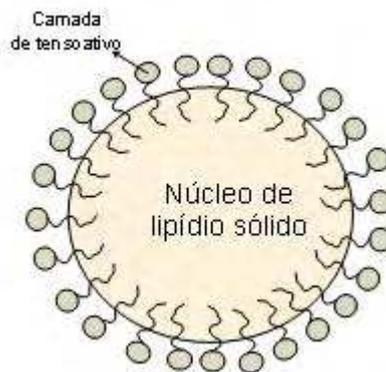


Figura 2.4. Esquema simplificado de uma partícula lipídica sólida (Fonte: MOLINA (2014))

Outro objetivo dos sistemas lipídicos de microencapsulação é a capacidade de preservação da bioatividade dos compostos encapsulados. Com essa finalidade, a utilização de lipídios sólidos aparece como uma alternativa interessante devido à redução da mobilidade do composto bioativo dentro da partícula. Os lipídios sólidos já haviam sido empregados na indústria farmacêutica

para administração via parenteral, hoje já é possível aplicá-las para via oral. Desde o início dos anos 90, os lipídios sólidos têm sido usados para administração oral na forma de pellets para conseguir uma entrega de bioativos sustentada e as micropartículas lipídicas sólidas (produzidas por spray drying) e os “*nanopellets*” são bons exemplos (WASAN, 2007; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000).

O diâmetro das partículas lipídicas sólidas pode variar, sendo produzidas em escala nanométrica (entre 20 e 200 nm), submicrométrica (200 a 1000 nm) e micrométrica (1 a 5  $\mu\text{m}$ ). Os métodos para produção das partículas podem ser divididos naqueles que utilizam baixa ou alta energia. Os métodos de alta energia utilizam dispositivos mecânicos para dispersão dos lipídios fundidos em outra fase, enquanto que os métodos de baixa energia baseiam-se na formação espontânea das partículas. Os métodos de alta energia empregam misturadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão e microfluidizadores, já os métodos de baixa energia empregam técnicas de emulsificação espontânea e da temperatura de inversão de fases. As dispersões produzidas com misturadores de alto cisalhamento ou ultrassom frequentemente contêm altas quantidades de micropartículas, o que não é um problema para a administração oral. Entretanto, caso o tamanho das partículas tenha que ser reduzido, ou seja, que nanopartículas lipídicas sólidas sejam produzidas, então o aumento da quantidade de tensoativo ou os métodos que empregam a homogeneização por alta pressão devem ser utilizados (MCCLEMENTS, 2012; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000; WASAN, 2007).

Dependendo das matérias primas lipídicas empregadas na preparação destas partículas lipídicas sólidas, se podem distinguir dois tipos básicos diferentes, cujas microestruturas estão esquematicamente mostradas na Figura 2.5:

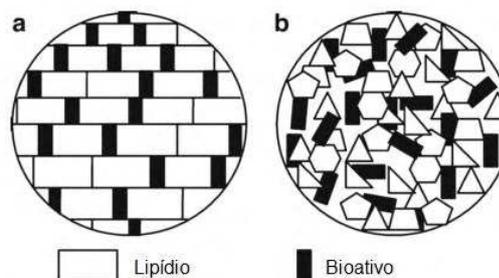


Figura 2.5. (a) Estrutura cristalina perfeita das partículas produzidas com somente um tipo de lipídio sólido; (b) estrutura com imperfeições das partículas produzidas com mais de um tipo de lipídio (Fonte: DAS; CHAUDHURY (2011))

Partículas lipídicas sólidas com a estrutura como a esquematizada na Figura 2.3(a) podem apresentar capacidade limitada de encapsulação e expulsão da droga durante a estocagem (DAS; CHAUDHURY, 2011; ZHUANG et al., 2010; WISSING et al., 2004; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Já na estrutura do tipo mostrado na Figura 2.3(b), tais limitações são minimizadas porque são produzidas pela mistura de lipídios diferentes (sólidos ou sólidos + líquidos), com cadeias carbônicas espacialmente incompatíveis, diferentes, que formam “espaços” ou “lacunas” no interior da matriz sólida (MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002). Esta última configuração “desordenada” é extremamente desejável para sistemas de microencapsulação, e podem ser facilmente produzidas e caracterizadas, inclusive utilizando-se matérias-primas de grau alimentício (SILVA et al., 2014; GOMES et al., 2013b; SEVERINO et al., 2011).

Portanto, é necessário que seja dada atenção ao estado físico das partículas que são formadas após a produção das partículas lipídicas sólidas não só devido às mudanças que podem ocorrer nas propriedades dos materiais utilizados para a formação da matriz lipídica quando estes são modificados para o estado coloidalmente disperso, mas também para determinar se, a longo prazo, o bioativo poderá ser incorporado ou expulso da matriz. Mesmo quando os lipídios cristalinos são utilizados para a preparação de dispersões, após o processamento, o estado físico destes compostos não é necessariamente o sólido. Isso acontece, por exemplo, quando o processo de preparação faz uso de calor, como é o caso da preparação por homogeneização dos materiais fundidos e a alteração do estado físico da matriz se dá devido a um fenômeno chamado de super-resfriamento que ocorre no estado disperso e não é só observado em lipídios. Na maioria dos casos, o estado será sólido ou parcialmente sólido. Para aplicações específicas, no entanto, atingir o estado de líquido super-resfriado pode ser interessante para alcançar propriedades particulares de carreamento ou para aumentar a biodisponibilidade de compostos lipofílicos. As técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e difratometria de raios-X (DR-X) podem auxiliar na determinação deste estado físico (DAS et al., 2011; BUNJES; UNRUH, 2007; MÜLLER; MADER; GOLHLA, 2000).

Essas alterações do estado físico da matriz lipídica se devem à ocorrência de diferentes formas polimórficas. O polimorfismo é comumente encontrado em materiais lipídicos e, portanto, também nas dispersões que utilizam lipídios em sua

composição. Existem três formas polimórficas:  $\alpha$ ,  $\beta'$  e  $\beta$  (em ordem crescente de estabilidade termodinâmica) que são caracterizados por diferentes tipos de empacotamento das cadeias lipídicas, diferentes ângulos de inclinação das cadeias lipídicas no que diz respeito às camadas de glicerídeos e de diferentes densidades moleculares. No que se referem à composição lipídica, as matrizes com um conteúdo elevado de diacilgliceróis (> 50%) cristalizam na forma polimórfica metaestável  $\beta'$ , que se caracteriza por alguma imperfeição na sua estrutura tridimensional. As matrizes lipídicas formadas por triacilgliceróis, esterificados com um único tipo de ácido graxo, cristalizam, normalmente, no polimorfo mais estável  $\beta$ , que se caracteriza por um grau de organização elevado. Adicionalmente, são encontradas outras formas polimórficas em misturas de acilgliceróis que são habitualmente referidas como formas  $\beta_i$ . O polimorfismo das principais modificações dos glicerídeos é do tipo monotrópico, ou seja, a forma com o maior ponto de fusão ( $\beta$ ) é termodinamicamente estável ao longo de toda a gama de temperaturas. Formas polimórficas metaestáveis podem, assim, transformar-se em uma forma mais estável durante o armazenamento. Dessa forma, imediatamente após a produção das partículas lipídicas sólidas, os lipídios cristalizam em modificações lipídicas de alta energia ( $\alpha$  e  $\beta'$ ). No entanto, com o passar do tempo, as moléculas lipídicas podem sofrer um processo de reestruturação que conduz à formação de modificações de baixa energia ( $\beta'$  e  $\beta$ ). A mistura de dois glicerídeos distintos também altera o comportamento de cristalização e fusão dos lipídios individualmente, bem como suas transições polimórficas. Para as partículas lipídicas sólidas é desejável que seja encontrada a forma  $\alpha$  e que essa seja mantida durante todo o período de armazenamento uma vez que esta permitirá uma maior capacidade de encapsulação e diminuir os riscos de expulsão do bioativo (DAS; CHAUDHURY, 2011; SOUTO et al., 2011; BUNJES; UNRUH, 2007; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000).

Os tensoativos utilizados para a preparação das dispersões podem influenciar as propriedades dos lipídios dispersos na matriz no que diz respeito ao seu comportamento de cristalização de diferentes formas. A utilização de tensoativos que contenham cadeias acila relativamente longas e saturadas conduz a um aumento da temperatura de cristalização, enquanto que a utilização de tensoativos que possuem resíduos curtos, ramificados ou insaturados e lipofílicos conduz à cristalização em temperaturas inferiores. A influência de alguns

tensoativos na temperatura de cristalização é atribuída também à indução de nucleação heterogênea devido a interações da massa lipídica fundida com a camada de tensoativo (TEJESWARE et al., 2014; BUNJES; UNRUH, 2007).

### **2.3. TRIACILGLICEROIS DE CADEIA MÉDIA E ÓLEOS LÁURICOS**

A maioria das gorduras e óleos utilizados na área de alimentos é composta por ácidos graxos de cadeia longa, e são chamados de triacilglicerois de cadeia longa ou LCTs. Os óleos de soja, milho, girassol e azeite de oliva são exemplos de produtos ricos em LCTs. Os óleos láuricos e óleos extraídos de sementes como o óleo de babaçu, no entanto, são compostos principalmente por TAGs contendo ácidos graxos com cadeias carbônicas contendo de 8 a 12 carbonos, denominados triacilglicerois de cadeia média (MCTs). São exemplos de MCTs o ácido octanóico (C8:0, ou ácido caprílico), o ácido decanóico (C10:0, ou ácido cáprico) e o ácido decanóico (C12:0, ou ácido láurico). Desde 1994, os MCTs são reconhecidos como ingredientes seguros (*GRAS*) pela FDA (POUTON; PORTER, 2008; MARTEN; PFEUFFER; SCHREZENMEIR, 2006; BEARE-ROGERS, 1988).

Existem algumas fontes naturais de ácidos graxos de cadeia média, como o óleo de côco e os óleos derivados da palma. Os óleos ricos em triacilglicerois de cadeia média são produzidos por hidrólise do óleo de côco ou do óleo de palma, filtrados para obtenção dos ácidos graxos de cadeia média e reesterificados. Estes óleos contêm quase que exclusivamente ácido octanóico e decanóico na proporção de 50:50 até 80:20 (MARTEN; PFEUFFER; SCHREZENMEIR et al., 2006; BEARE-ROGERS, 1988). Outros exemplos de óleos láuricos são o óleo de babaçu, utilizado neste trabalho de Mestrado, e a manteiga de murumuru.

Comparados com os LCTs, os MCTs têm ponto de fusão menor, menores massas molares e são líquidos ou semi-sólidos à temperatura ambiente. Essas distinções químicas e físicas afetam a forma com que os ácidos graxos de cadeia média são absorvidos e metabolizados de forma que os MCTs são absorvidos e metabolizados tão rapidamente quanto à glicose, enquanto que os LCTs mais lentamente. A maior parte da absorção dos ácidos graxos de cadeia média é feita por transporte para o fígado pelo sistema portal enquanto que os de cadeia longa exigem a formação de quilomícrons e chegam à circulação sistêmica através do sistema linfático. Os MCTs estimulam uma maior secreção de colecistoquinina, um hormônio que estimula a contração da vesícula biliar e do pâncreas, além de

estimular a secreção de fosfolipídios e colesterol quando comparados aos LCTs. Na presença de lipase pancreática ou deficiência de sais de bile, os ácidos graxos de cadeia média ainda podem ser absorvidos ao contrário dos de cadeia longa. Os MCTs também são aplicados para controle da obesidade e manutenção do peso, por possuírem propriedades termogênicas. Além disso, os MCTs podem reduzir os níveis de colesterol sérico e o acúmulo deste nos tecidos, e têm duas vezes a densidade calórica das proteínas e dos carboidratos (MARTEN et al., 2006; BEARE-ROGERS, 1988; BACH; BABAYAN, 1982).

Os triacilgliceróis de cadeia média (MCT) têm atraído significativamente a atenção no campo dos sistemas lipídicos de entrega, em parte por causa do aumento da velocidade da digestão, mas também pela capacidade destes promoverem uma melhor solubilização dos bioativos nas formulações. Isso ocorre porque a capacidade de solubilização de bioativos pelos triacilgliceróis é função da concentração de grupos éster, assim, MCTs tem geralmente uma maior capacidade de solubilização que os LCTs (POUTON; PORTER, 2008). Quando as formulações contendo MCT são submetidas aos modelos de lipólise *in vitro*, elas frequentemente mantêm os bioativos hidrofóbicos solubilizados após a digestão completa das formulações. De fato, para bioativos altamente lipofílicos essas formulações podem promover um estado aparentemente supersaturado no qual a concentração de bioativo excede a solubilidade nas formulações. O efeito de supersaturação é interessante para otimizar as formulações com base lipídica, uma vez que desenvolver formulações que apresentem o bioativo no estado de alta atividade termodinâmica é uma estratégia aceita para estimular a absorção passiva dos bioativos (PHAN et al., 2013; WASAN, 2007).

### **2.3.1. Óleo de Babaçu**

No Brasil encontra-se o babaçu que é uma palmeira nativa da Amazônia, sendo o óleo extraído de suas sementes (Figura 2.6). O babaçu é pertencente à família *Arecaceae* (Palmae) e membros dos gêneros *Orbignya* e *Attalea*. Estudos demonstram que o babaçu tem propriedades biológicas curativas, analgésicas e anti-inflamatórias, além de propriedades imunomoduladoras quando combinado com um sistema de liberação (PESSOA et al., 2015; SOUZA et al., 2013; GUMIERO; ROCHA FILHO, 2012).



Figura 2.6. Palmeira, fruto e óleo extraído das sementes do babaçu.

O óleo de babaçu possui cor branca, ligeiramente amarelada, e corresponde a 4% do peso total do fruto e, pelo menos, 68% das sementes. Este óleo contém uma grande variedade de ácidos graxos (Tabela 2.2), incluindo o ácido láurico e o mirístico em maior porcentagem, entretanto o ácido láurico é o componente principal responsável pelas propriedades terapêuticas da planta (PESSOA et al., 2015; FERREIRA; FAZA; LE HYARIC, 2012; GUMIERO; ROCHA FILHO, 2012).

Tabela 2.2. Perfil de ácidos graxo do óleo de babaçu (Fonte: BEARE-ROGERS, 1988)

Ácido Graxo	Composição (%)
Capróico	0,4
Caprílico	5,3
Cáprico	5,9
Láurico	44,2
Mirístico	15,8
Palmítico	8,6
Esteárico	2,9
Oleico	15,1
Linoleico	1,7
Eicosanóico	0,1

Assim, o óleo de babaçu é rico em MCTs e possui grande potencial para aplicações em sistemas de encapsulação. Entretanto, apesar de vários estudos sobre as propriedades da planta e dos seus produtos, a utilização do óleo de babaçu para desenvolvimento destes sistemas baseados em emulsões e dispersões foi pouco elucidada.

Gumiero & Rocha Filho (2012) utilizaram a técnica de emulsificação por inversão de fases para produção de nanoemulsões de óleo de babaçu. As partículas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 50 nm e

polidispersidade de 0,1. As formulações testadas por estes autores não apresentaram variação no diâmetro quando submetidas a stress térmico.

Por sua vez, Pessoa et al. (2015) desenvolveram um sistema de microemulsão óleo em água contendo óleo de babaçu, Span 80, Tween 80 e 1-butanol que apresentou comportamento newtoniano, viscosidade linear e diâmetro hidrodinâmico médio de 277 nm.

#### **2.4. DIGESTIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS ENCAPSULADOS EM SISTEMAS LIPÍDICOS DE MICROENCAPSULAÇÃO**

O termo biodisponibilidade é utilizado para indicar a proporção de bioativo que passa para a circulação sistêmica após a administração oral, levando-se em conta tanto a absorção quanto a degradação metabólica local. A biodisponibilidade pode ser afetada por variações na atividade enzimática da parede intestinal ou do fígado, no pH gástrico ou na motilidade intestinal. Além disso, o curto período de tempo em que um composto lipofílico fica em trânsito no intestino delgado pode limitar a absorção do mesmo, e no caso em que uma molécula lipofílica atinge o cólon antes da solubilização, é esperado que sua biodisponibilidade seja baixa (DAHANE HOFFMAN, 2008; VERSANTVOORT et al. 2005; RANG; DALLE; RITTER, 2001).

Bioativos encapsulados em sistemas de encapsulação lipídicos micro ou nanoparticulados serão consumidos por via oral e deglutidos, mas pouca absorção ocorre até que estes compostos alcancem o intestino delgado. Entretanto, para passar da luz do intestino delgado para a circulação sistêmica, o bioativo deve passar por um conjunto de enzimas que podem inativá-lo na parede intestinal e no fígado (RANG; DALE; RITTER, 2001). Desta forma, é importante produzir sistemas de encapsulação que possam maximizar sua liberação no trato gastrointestinal e absorção pela mucosa intestinal (MCCLEMENTS, 2012). Com o intuito de que as partículas encapsuladas cheguem a um determinado local do trato gastrointestinal, que a bioatividade do composto encapsulado seja mantida, e que a taxa de absorção do composto seja controlada, é importante que seja determinado o seu comportamento ao longo do trato gastrointestinal. A Figura 2.7 esquematiza os vários processos físico-químicos e fisiológicos que ocorrem quando um sistema de microencapsulação passa pelo trato gastrointestinal humano:

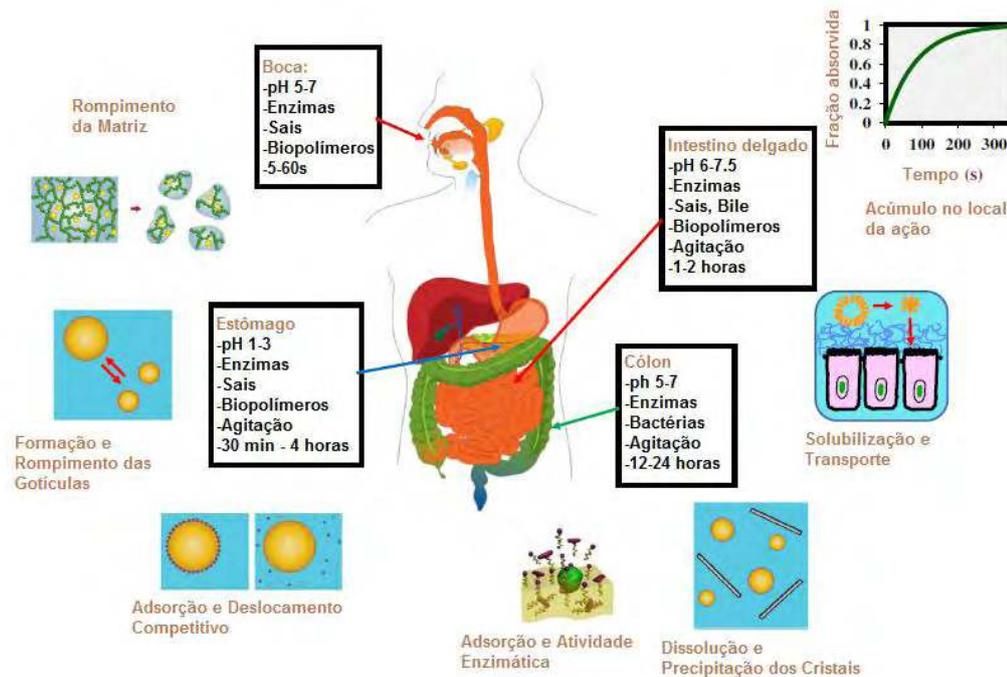


Figura 2.7. Processos físico-químicos e fisiológicos do trato gastrointestinal humano.(Fonte: adaptado de MCCLEMENTS (2012)).

Após a administração oral, a presença do lipídio no trato gastrointestinal leva à secreção de lipase gástrica pelas células da mucosa gástrica, e secreção de lipase pancreática e co-lipase pelo pâncreas. As lipases gástricas iniciam a digestão dos lipídios no estômago, o que resulta na digestão parcial dos triacilgliceróis em diacilgliceróis e ácidos graxos. Esta digestão é parcial (5-40%) devido às baixas concentrações de lipase no estômago e do pH ácido que desfavorece a atividade enzimática (10-1220 U/ml no compartimento gástrico e 80-7000 U/ml no trato duodenal). A magnitude de qualquer alteração gerada no estômago também depende do tempo de residência da formulação neste órgão, além das propriedades de dispersão e susceptibilidade intrínsecas à digestão. Baixas concentrações de sais de bile e fosfolipídios são encontradas no compartimento gástrico (MINEKUS et al., 2014; PORTER et al., 2007).

Os lipídios começam a ser emulsionados no estômago, e a seguir vão para o intestino delgado, onde boa parte da digestão dos triacilgliceróis é completada pela lipase pancreática, cuja ação ocorre na interface óleo-água. A presença de lipídios e produtos da digestão dos mesmos no intestino delgado diminui a velocidade de esvaziamento gástrico de forma a permitir a digestão e a absorção mais eficazes dos lipídios no trato gastrointestinal superior, além de estimular a secreção de bile

que solubiliza os ácidos graxos, monoacilgliceróis e diacilgliceróis que são produtos da digestão dos lipídeos e os incorporam em uma série de estruturas coloidais que ajudam a evitar a precipitação do bioativo e também favorecem sua absorção. É esperado que as propriedades físico-químicas e coloidais da formulação lipídica original não persistam por muito tempo *in vivo*. São os sistemas coloidais formados após a interação da formulação original com o trato gastrointestinal e pela intercalação de componentes da formulação e dos seus produtos de digestão com sais biliares, fosfolipídios e colesterol, que são os carreadores reais de bioativos, ou seja, estes sistemas que, de fato, são responsáveis pela absorção do bioativo pela mucosa intestinal (PORTER et al., 2008; PORTER et al., 2007; FATOUROS; BERGENSTAHL; MULLERTZ, 2007; KOSSENA et al., 2004).

## **2.5. MODELOS PARA ESTUDO DE DIGESTIBILIDADE E BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO***

A constatação de que o desempenho das formulações à base de lipídios é afetado pelos processos físico-químicos e fisiológicos da digestão e a incorporação de produtos de digestão exógenos em espécies micelares endógenas tem aumentado o uso de métodos de avaliação de digestibilidade para a avaliação *in vitro* das partículas lipídicas. Os métodos *in vitro* têm sido utilizados por fornecerem bons resultados de forma relativamente rápida, além de servirem como ferramentas para triagem de alimentos e sistemas de entrega com diferentes composições e estruturas (HUR et al., 2011b; PORTER et al., 2007).

Diversos modelos têm sido propostos para simular o processo digestivo através de aplicações *in vitro*. Os métodos simulam as condições da boca, do estômago, do intestino delgado e do intestino grosso através de etapas sucessivas. Pesquisadores têm utilizado os métodos *in vitro* para analisar o impacto dos componentes da digestão nas partículas lipídicas, como a lipase, os sais de bile, os níveis de cálcio e a presença de polissacarídeos. Além disso, também há estudos que auxiliam a compreensão dos fatores que impactam na digestão e na absorção dos lipídios através de análises das partículas lipídicas quanto ao diâmetro, concentração, composição e características da interface. Os modelos de digestibilidade *in vitro* que são realizados em laboratório podem ser divididos em duas categorias: modelos estáticos, em que processos físicos, tais como a hidratação, a homogeneização, cisalhamento, etc. são ignorados, e modelos

dinâmicos que simulam os processos físicos e mecânicos além de mudanças temporais que ocorrem em condições *in vivo* (MINEKUS et al., 2014; CHEN et al., 2011; HUR et al., 2011a; HUR et al. 2011b).

Segundo Golding e Wooster (2010), os modelos estáticos tentam recriar a bioquímica das diferentes regiões do trato gastrointestinal, individualmente ou em série. Para cada região, uma mistura de enzimas (lipases, proteases, etc.), sais biliares (biossurfatantes, fosfolípidos) e reguladores de acidez é utilizada, baseadas na compreensão das condições fisiológicas. As condições térmicas podem ser controladas para corresponder à temperatura corporal (37°C), entretanto são aplicadas agitações por agitadores magnéticos, impelidores ou shakers que não refletem a mistura gástrica que ocorre *in vivo*. Os modelos estáticos, no entanto, são capazes de mensurar reações digestivas como a liberação de ácidos graxos que ocorram durante a lipólise (GOLDING; WOOSTER, 2010). Por esse e outros motivos, os modelos estáticos são mais encontrados na literatura e têm sido mais utilizados para estudos de liberação controlada de carotenóides e polifenóis (MINEKUS et al., 2014; CHEN et al., 2011; HUR et al., 2011a; HUR et al. 2011b).

O trato gastrointestinal é um sistema complexo que visa proporcionar nutrição e energia ótimas para o corpo e através de um sistema de feedback é possível que seja regulada cada etapa da digestão. Entretanto podem ocorrer variações neste feedback, individualmente, baseado na idade, constituição do corpo e hábitos. Isso resulta em variações em fatores como a mastigação, tempo de esvaziamento gástrico, secreção de fluidos digestivos e tempos de trânsito intestinal. Um sistema *in vitro* não inclui a interação complexa que ocorre entre o alimento e o corpo, entretanto, neste modelo, é possível ter um controle maior sobre as condições de ensaio que são causa de grande variabilidade *in vivo* e por isso dispensa um grande número de replicatas para que se faça uma análise estatística adequada (MINEKUS et al., 2014; HUR et al., 2011b; GOLDING; WOOSTER, 2010; OOMEN et al., 2003).

A função do estômago é preparar e gradualmente liberar o alimento para o intestino delgado. O esvaziamento gástrico ocorre gradualmente, e é fortemente determinado pelo valor calórico dos nutrientes que entram no duodeno. Durante a fase gástrica, o alimento é diluído pelo suco gástrico que contém enzimas e ácido clorídrico. Pepsina, lipase gástrica e amilase salivar possuem seu pH ótimo em 2,5, 5,4 e 6,8 respectivamente. No estado de jejum, o pH no estômago é em torno de 2

ou menor. Durante a ingestão de alimentos, o pH aumenta dependendo da capacidade tamponante do alimento. Após isso, o pH é gradualmente diminuído através da secreção de ácido clorídrico. A baixa penetração de ácido em alimentos sólidos resulta em um pH alto por mais tempo no interior do bolo alimentar. Isso implica que durante o esvaziamento gástrico diferentes frações do alimento são expostas a diferentes valores de pH e atividades enzimáticas. Os modelos estáticos expõem todos os substratos a um pH determinado e atividades enzimáticas específicas, durante um tempo fixo. Geralmente o pH é mantido em 2, que pode ser considerado correto para o estado de jejum, entretanto não reflete o pH correto após a ingestão do alimento (MINEKUS et al., 2014; HUR et al., 2009; OOMEN et al., 2003). *In vivo*, no duodeno, o quimo que é gradualmente esvaziado do estômago é neutralizado com bicarbonato e misturado com bile e suco pancreático. Dessa forma, há a manutenção do pH próximo a 6,5 no início do duodeno e um aumento do pH ao longo do comprimento do intestino até valores próximos a 7,5 quando o quimo atinge o íleo. Para simulação de condições estáticas utiliza-se o valor médio de pH 7,0 (MINEKUS et al., 2014; HUR et al., 2009; OOMEN et al., 2003). Durante as 3 horas de transporte que ocorre no intestino delgado, ocorre uma variação nas quantidades de enzima e substratos presentes e em suas proporções devido à digestão e absorção de produtos e água. Entretanto os modelos estáticos não incluem essa remoção dos produtos da digestão, o que pode causar a inibição das enzimas utilizadas. Todavia este problema é geralmente resolvido com a utilização de baixas concentrações de substrato em um sistema diluído (MINEKUS et al., 2014; HUR et al., 2011b). Os modelos de digestibilidade *in vitro* não levam o intestino grosso em conta, isso porque a absorção de compostos ocorre principalmente no intestino delgado. Para determinação da biodisponibilidade, portanto, apenas a determinação no quimo proveniente do intestino delgado já é suficiente. Quando as amostras que serão submetidas aos métodos *in vitro* contêm teores de lipídios elevados, é necessário que seja adicionado mais enzima (lipases) ou pancreatina e sais de bile e o tempo de digestão também deve ser aumentado (BRANDON et al., 2006).

Os ensaios *in vitro* são uma simplificação da realidade e deve incluir todos os parâmetros necessários para atingir determinado objetivo. Entretanto, quanto mais parâmetros são considerados importantes e incluídos, maior a complexidade do modelo. Existe uma grande variação nos parâmetros utilizados nos diferentes

métodos descritos na literatura, o que dificulta a comparação entre os dados obtidos por diferentes grupos de pesquisa. Essa dificuldade gerou iniciativas como a ação “*COST Infogest Network*” que visa consolidar um modelo de digestibilidade consensual baseado no conhecimento atual sobre o processo de digestão *in vivo*, e emprega instrumentação e produtos químicos amplamente disponíveis (MINEKUS et al., 2014; HUR et al., 2011b).

Dentre os modelos mais utilizados para estudos de digestibilidade *in vitro* estática, destaca-se o modelo tipo *pH-stat*. A justificativa do emprego do método *pH-stat* se baseia em três fatores: (i) ele pode manter o pH constante, imitando os mecanismos fisiológicos; (ii) pode efetivamente simular o processo de lipólise com alta confiabilidade; (iii) como a estequiometria da reação entre os ácidos graxos liberados e a quantidade de íons  $\text{OH}^-$  usados na titulação é 1:1, pode-se quantificar a extensão do processo de lipólise com alta margem de segurança (MINEKUS et al., 2014; NIK; WRIGHT, 2011a; NIK; CORREDIG; WRIGH et al., 2010; DAHAN; HOFFMAN, 2008).

Este método vem sendo empregado especialmente para a fase de digestão duodenal, em que há necessidade de controle contínuo do pH já que, *in vitro*, devido à liberação de ácidos graxos durante a hidrólise enzimática dos triacilgliceróis, o ambiente tende a se tornar ácido (LI et al., 2011; NIK; WRIGHT, 2011a; NIK; CORREDIG; WRIGH, 2010; DAHAN; HOFFMAN, 2008).

Após completar o processo de digestão duodenal simulada, pode-se centrifugar o meio reacional, sendo que a fase superior (sobrenadante) obtidos conterá os sais de bile, os ácidos graxos livres e os monoacilgliceróis, em sua maior parte na forma micelar, englobando a parte dos ativos hidrofóbicos que tenham sido liberados durante a digestão simulada. Sendo assim, é possível estimar a bioacessibilidade de tais ativos, uma vez que só serão absorvidos caso tenham sido transferidos para a fase micelar (NIK; CORREDIG; WRIGHT, 2010; DAHAN; HOFFMAN, 2008).

Fatores como as características das partículas, a atividade enzimática, a composição iônica, estresses mecânicos e o tempo de digestão têm significativa influencia nos resultados de métodos de digestão *in vitro* (HUR et al., 2011). Formulações lipídicas complexas, contendo tensoativos e co-solventes podem ser avaliadas utilizando a lipólise *in vitro* como indicativo de desempenho, além de fornecerem medidas mais concretas quando comparadas às medições de

solubilidade e tamanho de partícula. Porter et al. (2007) ainda sugerem que o desempenho de uma formulação está pouco relacionado com o tamanho inicial da partícula, mas sim com os padrões de solubilização obtidos após a dispersão e digestão da formulação em simulações de fluidos intestinais.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho de Mestrado foi avaliar a influência da utilização de triacilglicerois de cadeia média (presentes no óleo de babaçu) e da concentração de tensoativo na estabilidade, digestibilidade e bioacessibilidade da quercetina microencapsulada em partículas lipídicas sólidas.

Para atingir este objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

(i) avaliação da capacidade de encapsulação da quercetina pelas micropartículas lipídicas sólidas utilizando diferentes formulações;

(ii) avaliação da extensão em que as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com o óleo de babaçu e triestearina são digeríveis pelo trato gastrointestinal humano, e se a presença de triacilglicerois de cadeia média influi na extensão da hidrólise enzimática;

(iii) determinar a influência da concentração de tensoativo nas formulações na estabilidade e digestibilidade das micropartículas lipídicas sólidas;

(iv) inferir a influência da presença dos triacilglicerois de cadeia média e da concentração de tensoativo na biodisponibilidade da quercetina encapsulada nas micropartículas lipídicas sólidas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

Água deionizada obtida de um sistema de ultrapurificação Direct Q3 (Millipore) foi utilizada para preparação de todas as soluções e dispersões.

#### 4.1.1. Produção das micropartículas lipídicas sólidas

Para a produção das micropartículas foram utilizados dois tipos de lipídeos: triestearina (Sigma-Aldrich - São Paulo, Brasil) e óleo de babaçu (obtido da castanha de *Orbygnia speciosae* adquirido da Jacy Fragrâncias). O bioativo incorporado foi a quercetina (CAS 117-39-5), obtido da Sigma-Aldrich. Os tensoativos escolhidos foram o polisorbato 60 (Tween 60®, Sigma-Aldrich) como tensoativo hidrofílico e o éster de monooleato de sorbitan (Span 80, Sigma-Aldrich) como tensoativo lipofílico.

A temperatura de fusão dos lipídios utilizados, assim como os valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) e a estrutura molecular dos tensoativos utilizados são apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2 respectivamente.

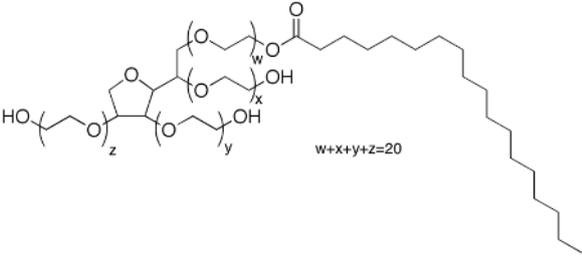
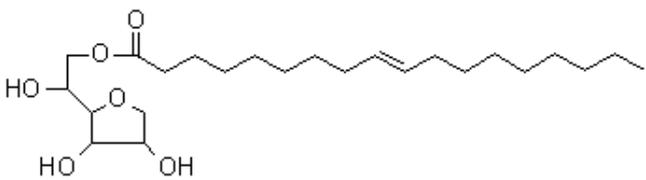
Goma xantana (Grindsted Xanthan 80®, doada pela Danisco, Cotia, Brasil) foi empregada como espessante em todas as formulações de micropartículas lipídicas sólidas assim como o benzoato de sódio como agente antimicrobiano e antifúngico.

Tabela 4.1. Temperatura de fusão e sigla dos lipídios utilizados para a produção das micropartículas lipídicas sólidas

Lipídio	Sigla	Temperatura de Fusão*	Molécula
Triestearina	TS	60°C	$\text{CH}_3 \left[ \text{CH}_2 \right]_7 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \left[ \text{CH}_2 \right]_7 \text{C}(=\text{O}) \text{O} \text{C}(=\text{O}) \text{CH}_2$ $\text{CH}_3 \left[ \text{CH}_2 \right]_7 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \left[ \text{CH}_2 \right]_7 \text{C}(=\text{O}) \text{O} \text{C}(=\text{O}) \text{CH}$ $\text{CH}_3 \left[ \text{CH}_2 \right]_7 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \left[ \text{CH}_2 \right]_7 \text{C}(=\text{O}) \text{O} \text{C}(=\text{O}) \text{CH}_2$
Óleo de Babaçu	OB	25,5°C	—

\*Fonte: SILVA (2013)

Tabela 4.2. Dados sobre os tensoativos utilizados na produção das micropartículas lipídicas sólidas

Tensoativo	EHL*	Molécula
Tween 60	14,9	
Span 80	4,3	

\*Fonte: SILVA (2013)

#### 4.1.2. Caracterização das micropartículas lipídicas sólidas

Para a determinação da eficiência de encapsulação, foi utilizado etanol absoluto p.a. (Merck) e membranas para centrifugação (Amicon<sup>®</sup> Ultra –Ultracel 30K, Millipore). Já para a determinação da concentração de quercetina, foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO, obtido da Merck) e membranas de 0,45 µm (Millex LCR, Millipore).

#### 4.1.3. Avaliação da digestibilidade *in vitro* das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina

Para determinar a atividade da pepsina foi utilizada hemoglobina (referência H2500 Sigma-Aldrich), HCl (Chemycalis), pepsina Porcina (referência P6887 Sigma-Aldrich), NaCl (Synth), NaOH (Synth), ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich).

Para os ensaios de atividade de tripsina, foi utilizado TAME (p-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester) (referência T4626 Sigma-Aldrich), HCl (Chemycalis), TRIS (Tris-hidroxymethyl-aminometane) (Merck), pancreatina porcina (8 x USP specifications, referência P7545 Sigma-Aldrich).

Já para determinação da atividade de lipase pancreática foi utilizado TRIS (Tris-hidroxymethyl-aminometane) (Merck), NaCl (Synth), CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>

(Chemycalis), taurodeoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich), NaOH (Synth), HCl (Chemycalis), tributirina (Sigma-Aldrich), lipase pancreática porcina (referência L3126 Sigma-Aldrich), pancreatina porcina (8 x USP specifications, referência P7545 Sigma-Aldrich).

Além dos materiais descritos, utilizou-se também extrato de bile porcina (referência B8631 Sigma-Aldrich).

Para preparação das soluções de eletrólitos foram utilizados: KCl (Synth),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Synth),  $\text{NaHCO}_3$  (Chemycalis), NaCl (Synth),  $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$  (Chemycalis),  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (Merck), HCl (Chemycalis) e  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  (Chemycalis).

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Produção das micropartículas lipídicas sólidas

As massas adequadas de cada um dos componentes foram pesadas segundo as formulações descritas na Tabela 4.3 e separadas em béqueres distintos como descrito abaixo:

1. Solução aquosa: água e PS 60.
2. Mistura lipídica: OB, TS e SP 80.

A solução aquosa e a mistura de lipídios foram colocadas em banho-maria sob temperatura controlada até atingirem  $10^\circ\text{C}$  acima do ponto de fusão da triestearina ( $\text{PF}_{\text{TS}} = 60^\circ\text{C}$ ). Então a quercetina foi solubilizada na fase lipídica e a solução aquosa quente foi imediatamente misturada à solução lipídica. A solução final foi a seguir submetida à ultra-agitação (Ultraturrax T25, IKA) também com temperatura controlada ( $\approx 70^\circ\text{C}$ ) usando-se intensidade de agitação de 18.000 rpm por 5 minutos.

Em seguida, a dispersão foi deixada sob agitação magnética por 5 minutos em banho de gelo até atingir cerca de  $20^\circ\text{C}$ . Nesta etapa foram adicionados à dispersão goma xantana (0,05%) e o benzoato de sódio (0,02%) (SILVA, 2013).

Tabela 4.3. Formulações empregadas na produção das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina

Formulação*	Fase Lipídica		Tensoativo	
	% Total (Massica)	Composição	% Total (Massica)	Composição
1,2_2,0	4	2,8% TS + 1,2% OB	2	1,4% SP 80 + 0,6% PS 60
2,0_2,0	4	2,0% TS + 2,0% OB	2	1,4% SP 80 + 0,6% PS 60
2,8_2,0	4	1,2% TS + 2,8% OB	2	1,4% SP 80 + 0,6% PS 60
1,2_2,5	4	2,8% TS + 1,2% OB	2,5	1,75% SP 80 + 0,75% PS 60
2,0_2,5	4	2,0% TS + 2,0% OB	2,5	1,75% SP 80 + 0,75% PS 60
2,8_2,5	4	1,2% TS + 2,8% OB	2,5	1,75% SP 80 + 0,75% PS 60
1,2_3,0	4	2,8% TS + 1,2% OB	3	2,1% SP 80 + 0,9% PS 60
2,0_3,0	4	2,0% TS + 2,0% OB	3	2,1% SP 80 + 0,9% PS 60
2,8_3,0	4	1,2% TS + 2,8% OB	3	2,1% SP 80 + 0,9% PS 60
1,2_3,5	4	2,8% TS + 1,2% OB	3,5	2,45% SP 80 + 1,05% PS 60
2,0_3,5	4	2,0% TS + 2,0% OB	3,5	2,45% SP 80 + 1,05% PS 60
2,8_3,5	4	1,2% TS + 2,8% OB	3,5	2,45% SP 80 + 1,05% PS 60
1,2_4,0	4	2,8% TS + 1,2% OB	4	2,8% SP 80 + 1,2% PS 60
2,0_4,0	4	2,0% TS + 2,0% OB	4	2,8% SP 80 + 1,2% PS 60
2,8_4,0	4	1,2% TS + 2,8% OB	4	2,8% SP 80 + 1,2% PS 60

\*o primeiro número indica a porcentagem total de óleo de babaçu na formulação, enquanto que o segundo número indica a porcentagem de tensoativo utilizado para produção das partículas.

Para os estudos realizados, foram produzidas 3 replicatas de cada formulação para obtenção dos dados de caracterização e estabilidade, que foram armazenadas sob refrigeração.

#### 4.2.2. Caracterização e estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas

##### 4.2.2.1. Eficiência de encapsulação da quercetina

Foram pipetados 10 mL de cada uma das amostras e colocados em tubos de ensaio de 15 mL com membranas de ultrafiltração de massa molar de corte de 100 kDa (Millipore) . As amostras foram então submetidas à centrifugação por 30 minutos a 4000 rpm e 4°C. Os ultrafiltrados obtidos contendo a quercetina não-encapsulada foram coletados, diluídos na proporção de 1:20 em etanol e, em seguida, foram feitas as leituras de absorvância por espectrofotometria utilizando-se o comprimento de onda de 373 nm (LI et al., 2009). Para quantificação da

quercetina, foi construída uma curva de calibração do flavonoide em etanol, com concentrações variando de 0 a 10 µg/mL.

#### **4.2.2.2. Quantificação de quercetina encapsulada**

Primeiramente foi construída uma curva de calibração de quercetina em DMSO, em concentrações variando de 0 a 10 µg/mL

A quantificação de quercetina foi feita então pela análise dos dados obtidos pela leitura em triplicata das absorbâncias a 373 nm das amostras de micropartículas diluídas na proporção de 1:40 (amostra de micropartículas:DMSO) e filtradas em membranas de 0,45 µm (Millex LCR, Millipore) para retirada de eventuais agregados que pudessem resultar em turbidez na leitura espectrofotométrica (POOL et al., 2013).

Os sistemas foram avaliados durante 30 dias em relação à preservação da quercetina.

#### **4.2.2.3. Determinação de distribuição de tamanho, diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta das micropartículas**

Antes das medições de distribuição de tamanho e diâmetro hidrodinâmico médio as dispersões foram diluídas em água ultrapurificada para evitar o efeito de espalhamento múltiplo. Os dados foram determinados por difração a laser no Laboratório de Processos de Engenharia de Alimentos, ZEA/FZEA/USP, e por espectroscopia de correlação de fótons (PCS, por espalhamento de luz) em equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, EUA). O comprimento de onda do laser foi de 657 nm, em ângulo de incidência igual a 90°. Foram realizadas dez corridas para cada amostra e as análises de dados foram realizadas pelos softwares incluídos nos equipamentos.

Já antes das determinações de potencial zeta, as dispersões foram diluídas em solução de KCl 0,1M. A determinação foi feita por mobilidade eletroforética em equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, EUA). Foram realizadas dez corridas para cada amostra e a análise de dados foi realizada pelo software incluído no equipamento.

Os sistemas foram avaliados em relação a estas análises durante 30 dias.

#### **4.2.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Após a produção das micropartículas, os sistemas coloidais contendo 1,2% de óleo de babaçu e 4% de tensoativos foram observados em microscópio eletrônico de varredura TM 3000 Tabletop microscope (Hitachi, Tokyo, Japão) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, ZEA/FZEA/USP. Antes da obtenção das imagens, as amostras foram acomodadas em fitas dupla-face de carbono (Ted Pella, Inc., Redding, EUA), fixadas em stubs de alumínio e secas a temperatura ambiente por 24 horas.

#### **4.2.2.5. Determinação do comportamento térmico das micropartículas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

O comportamento térmico das micropartículas lipídicas sólidas foi analisado em duplicata por calorimetria diferencial de varredura (DSC), no intervalo de 0 a 100°C, utilizando-se rampa de aquecimento de 10° C/min, em equipamento TA5000 (TA Instruments, EUA), empregando-se um cadinho de alumínio vazio como referência, sob atmosfera inerte (45 mL/min N<sub>2</sub>) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos FZEA/USP.

#### **4.2.3. Avaliação da digestibilidade *in vitro* das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina**

##### **4.2.3.1. Determinação das atividades das enzimas utilizadas**

Os ensaios para determinação das atividades enzimáticas foram realizados segundo os protocolos descritos no material eletrônico suplementar (ESI) fornecido por Minekus et al. (2014). A atividade da pepsina porcina baseia-se na utilização da hemoglobina do sangue bovino como substrato: uma unidade irá produzir  $\Delta A_{280}$  de 0,001 por minuto, a pH 2,0 e 37°C, medido como produtos solúveis em TCA. A atividade de tripsina porcina baseia-se no p-tolueno-sulfonil-L-arginina metil ester (TAME) como substrato: uma unidade hidrolisa 1 mmol de TAME por minuto a 25°C, pH 8.1. Já a atividade de lipase pancreática porcina baseia-se na tributirina como substrato: uma unidade libera 1 mmol de ácido butírico por minuto a 37°C e em pH 8,0 (MINEKUS et al., 2014). As concentrações de sais biliares foram estimadas com base em dados fornecidos por laboratórios parceiros do Departamento de Ciências dos Alimentos da University of Guelph (Canadá).

#### 4.2.3.2. Preparação dos fluidos simulados utilizados nos ensaios de digestibilidade *in vitro*

Todas as soluções foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por Minekus et al. (2014) com a finalidade de atingir concentrações adequadas de eletrólitos nas soluções finais.

Para a utilização na fase gástrica, foi preparada uma solução de eletrólitos inicial seguindo a composição da Tabela 4.4, o pH foi ajustado para 3 com NaOH 1M e/ou HCl 1M.

Tabela 4.4. Composição da solução de eletrólitos utilizada na fase gástrica

Componente	Concentração na solução estoque	Volume na solução de eletrólitos da FG (mL)*
KCl	37,3 g/L	6,9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68 g/L	0,9
NaHCO <sub>3</sub>	84 g/L	12,5
NaCl	117 g/L	11,8
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5 g/L	0,4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48 g/L	0,5
HCl	6 mol/L	1,3

\*volumes utilizados para preparação de 400 mL de solução de eletrólitos para fase gástrica.

Para a utilização na fase duodenal, foi preparada uma solução de eletrólitos inicial seguindo a composição da Tabela 4.5, o pH foi ajustado para 7 com HCl 1M.

Tabela 4.5. Composição da solução de eletrólitos utilizada na fase gástrica

Componente	Concentração na solução estoque	Volume na solução de eletrólitos da FD (mL)*
KCl	37,3 g/L	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68 g/L	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	84 g/L	42,5
NaCl	117 g/L	9,6
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5 g/L	1,1
HCl	6 mol/L	0,7

\*volumes utilizados para preparação de 400 mL de solução de eletrólitos para fase duodenal.

Foi preparada também uma solução de  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  0,3M que foi adicionada separadamente às misturas finais submetidas ao processo de digestão simulada. Este composto não foi adicionado às soluções de eletrólitos uma vez que é possível que ocorra precipitação (MINEKUS et al., 2014).

#### **4.2.3.3. Ensaios de digestibilidade *in vitro* pH stat**

Após a determinação das atividades das enzimas a serem utilizadas, da preparação das soluções estoque de eletrólitos, dos pHs devidamente ajustados e imediatamente antes do início de cada ensaio, as enzimas e o extrato de bile foram preparados de forma a atingir as concentrações e atividades enzimáticas necessárias descritas na metodologia proposta por Minekus et al. (2014). Desta forma, foram preparadas as seguintes soluções: pepsina porcina em solução de eletrólitos da fase gástrica a 25.000 U/mL, solução de pancreatina em solução de eletrólitos da fase intestinal a 800 U/mL (atividade de tripsina), solução de lipase a 25.000 U/mL e extrato de bile a 160 mM em água deionizada.

Assim, pôde-se iniciar o processo de digestão simulada como descrito abaixo:

Fase gástrica: Em um béquer de 50 mL, 10 mL de dispersão foram misturados a 1,6 mL de solução 25.000 U/mL de pepsina, 6,4 mL de solução de eletrólitos da fase gástrica, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  0,3M, 0,2 mL de HCl 1M e 1,795 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado a 3 com HCl 1M e deixado sob agitação em agitador orbital a 200 rpm por 1 hora a 37°C.

Fase duodenal: Após o tempo necessário para simular a fase gástrica, os 20 mL de quimo proveniente da mesma foi misturado a 7,8 mL de solução de eletrólitos da fase intestinal, 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  0,3M, 0,15 mL de NaOH 1M e 1,31 mL de água ultrapura. Imediatamente antes de ser iniciada a função pH-stat do titulador Titrand 902 (Metrohn), foi adicionada a mistura as soluções enzimáticas e a solução de extrato de bile na seguinte ordem: 3,2 mL de solução de lipase 25.000 U/mL, 5 mL de solução de pancreatina 800 U/mL e 2,5 mL de solução de extrato de bile 160mM. Então o equipamento foi ligado para manutenção do pH em 7 com dosagem automática de NaOH 1M (molaridade real determinada antes do ensaio) e determinação de ácidos graxos livres durante 2 horas, a 37°C sob agitação magnética branda.

Utilizando-se os volumes descritos, foram atingidas as concentrações de eletrólitos adequadas para cada fase simulada.

Os ensaios de digestibilidade *in vitro* foram realizados em triplicata para cada uma das formulações de micropartículas.

Em diversas etapas do estudo realizado foi feita a visualização das partículas em microscópio ótico (BEL PHOTONIX, câmera 1.3 MP) no Laboratório de Produtos Funcionais, ZEA/FZEA/USP sendo as imagens computadas pelo software BEL VIEW.

#### **4.2.3.4. Quantificação da liberação de ácidos graxos durante a digestão *in vitro* simulada**

A liberação de ácidos graxos livres foi acompanhada durante as 2 horas da fase duodenal. Foram anotados os valores de pH e volume da NaOH 1M utilizados para neutralizar os ácidos e manter o pH em 7 a cada 5 minutos.

A molaridade real da solução de NaOH foi previamente determinada, e através da Equação 1, a porcentagem de ácidos graxos liberados foi calculada.

$$\%AGL = 100 \times \left( \frac{V_{NaOH} \times M_{NaOH} \times MM_{lip\ idio}}{w_{lip\ idio} \times 2} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

Na Equação (1),  $V_{NaOH}$  é o volume de hidróxido de sódio requerido para neutralizar os ácidos graxos produzidos (em mililitros),  $M_{NaOH}$  é a molaridade do hidróxido de sódio utilizado (em M),  $MM_{lip\ idio}$  é a massa molar do óleo de referência (284,4772g/mol para ácido esteárico), e  $w_{lip\ idio}$  é a massa total de lipídio inicial (em gramas).

#### **4.2.3.5. Monitoramento das modificações das micropartículas durante a digestão *in vitro* simulada**

A fim de verificar a integridade das partículas durante o processo de digestão simulada, o diâmetro médio e o potencial zeta foram acompanhados de 20 em 20 minutos desde o início da fase gástrica até o fim da fase duodenal conforme descrito no item 4.2.2.3.

Fez-se também o acompanhamento da integridade das partículas por microscopia ótica.

#### **4.2.4. Avaliação da bioacessibilidade da quercetina microencapsulada**

A biodisponibilidade da quercetina foi avaliada através da quantificação da quercetina presente na fase micelar, ao final da fase de digestão duodenal. O quimo proveniente do fim da digestão foi transferido para um tubo falcon e as micelas foram separadas por centrifugação (3300 rpm por 50 minutos). Foram então transferidos para tubos falcon 3 amostras de 1 ml da fração do meio do centrifugado e a quercetina extraída com a adição de 9 mL de dimetilsulfoxido em cada tubo. As misturas foram então centrifugadas novamente para remoção de possíveis partículas em suspensão (3300 rpm por 10 minutos) e as frações inferiores cuidadosamente coletadas e submetidas a filtração em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millex LCR, Millipore). A seguir a quercetina foi quantificada por espectrofotometria, sendo a absorbância determinada a 373 nm. A proporção de flavonoide transferida para a fase aquosa foi calculada baseando-se na quantidade inicial encapsulada nas micropartículas lipídicas sólidas.

#### **4.2.5. Análise estatística dos dados**

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos ao procedimento ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 95% de significância, utilizando-se o software SAS 9.2.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE QUERCETINA A SER ENCAPSULADA NAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Estudos realizados no Laboratório de Coloides e Funcionalidade de Macromoléculas (FZEA/USP) anteriormente ao início dos ensaios de encapsulação da quercetina nas matrizes lipídicas indicaram a estabilidade durante 46 dias dos sistemas coloidais produzidos com 4% de tensoativo (2,8% de SP80 e 1,2% de PS60). O valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) foi de 7,48. Foram determinadas também as condições ideais para produção das partículas, sendo que o tempo de agitação a 18.000 rpm foi de 5 minutos para obtenção da dispersão homogênea e estável. A concentração de lipídios nas formulações também foi sempre de 4%, entretanto, variou-se a proporção de óleo de babaçu e triestearina em três formulações distintas, as quais não apresentaram diferença significativa em relação à estabilidade: formulações 1,2\_4,0, 2,0\_4,0 e 2,8\_4,0 (SILVA et al., 2014).

A partir destes dados preliminares, foram iniciados os experimentos para determinação da massa de quercetina a ser incorporada na formulação. As concentrações testadas foram baseadas em estudo realizado por Pool et al. (2013) no qual é determinada a solubilidade da quercetina em triacilgliceróis de cadeia média em várias temperaturas.

Um dos principais fatores que determinam a eficiência de um sistema de microencapsulação é a quantidade máxima de bioativo que pode ser solubilizada dentro dele. Abaixo deste nível de saturação o componente bioativo é totalmente solubilizado, todavia, acima deste nível, pode haver a formação uma fase sólida isolada, isto é, uma fase cristalina ou amorfa (POOL et al., 2013). Desta forma, foram testadas concentrações de quercetina de 0,15 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL e 0,4 mg/mL para produção das micropartículas. As dispersões contendo 0,15 mg/mL, 0,2 mg/mL e 0,3 mg/mL apresentaram aspecto semelhante. Notou-se, entretanto, que as dispersões produzidas com 0,4 mg/mL de quercetina apresentaram um aumento significativo de viscosidade, o que pode ser indicativo de não-incorporação de parte da quercetina adicionada na formulação (POOL et al., 2013). Desta forma, a concentração máxima de quercetina a ser encapsulada foi estabelecida como 0,3 mg/mL. É interessante observar que esta concentração está bem abaixo do limite de solubilidade do flavonoide em uma mistura de

triacilgliceróis de cadeia média (Mygliol 812®), conforme mostrado por Pool et al. (2013) que, a 70°C (temperatura de produção das micropartículas) é de cerca de 3,5 mg/mL. As amostras de ultrafiltrados obtidos de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.2.1 indicaram que não havia quercetina não-encapsulada, indicando que, ao se utilizar 0,3 mg quercetina/mL de formulação, 100% do flavonoide estaria encapsulado no interior da micropartícula lipídica.

Assim, após a produção das micropartículas, as dispersões apresentaram aspecto semelhante: levemente amareladas, opacas, líquidas, sem odor e homogêneas, como pode ser visualizado na Figura 5.1. O aspecto leitoso das partículas pode ser atribuído ao espalhamento de luz causado pelas partículas (MCCLEMENTS, 2002).



Figura 5.1. Aspecto visual da dispersão de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de babaçu e triestearina, encapsulando quercetina.

Desta forma, foram iniciados os estudos de caracterização e estabilidade das dispersões como descrito a seguir.

## 5.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ENCAPSULANDO QUERCETINA, AO LONGO DO TEMPO DE ARMAZENAGEM.

### 5.2.1. Concentração de quercetina encapsulada, diâmetro hidrodinâmico médio, distribuição de tamanho e potencial zeta.

Os tensoativos presentes nas formulações das dispersões podem afetar a cristalização da matriz lipídica que é atribuída à indução de nucleação heterogênea devido à interação do lipídio com a camada de tensoativo. Além disso, se a concentração ideal para formação das dispersões não for atingida, pode haver a não-formação das dispersões (SOUTO et al., 2011; BUNJES; UNRUH, 2007; WASAN, 2007). Dessa forma, a fim de verificar se concentrações menores de tensoativo poderiam estabilizar as dispersões, foram produzidas partículas contendo 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0% de tensoativo na formulação.

As partículas contendo 1,0 e 1,5% de tensoativo desestabilizaram no dia zero, sendo que a aquelas produzidas com 1,0% de tensoativo apresentaram separação de fases com a formação de gotículas de óleo na fração superior da amostra (Figura 5.2 (a)), enquanto que as produzidas com 1,5% de tensoativo flocularam (Figura 5.2 (b)). Assim, estas formulações foram descartadas.



Figura 5.2. Aspecto das disperses produzidas com 1,0% (a) e 1,5% (b) de tensoativo.

As formulações contendo de 2,0 a 4,0% de tensoativo permaneceram estáveis e sem formação de creme, floculação ou separação de fases, indicando que a quantidade de tensoativo utilizada foi suficiente para estabilizar as emulsões (DAS et al., 2011). Desta forma, as micropartículas produzidas com mais de 2,0% de tensoativo foram acompanhadas por 30 dias de estocagem, sob refrigeração, para verificar variações na capacidade de encapsulação das partículas e a ocorrência de alterações significativas nas concentrações de quercetina encapsulada durante este período, e os resultados são apresentados na Tabela 5.1. Para verificar se as alterações nas concentrações de quercetina foram significativas e se houve também diferença entre as formulações, foi realizada a análise estatística dos dados de concentração de quercetina. Os dados foram submetidos ao procedimento ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 95% de significância e os resultados também são mostrados na Tabela 5.1.

Existem quatro principais fatores que influenciam a capacidade de encapsulação de um composto na matriz lipídica: a solubilidade do bioativo no lipídio fundido, a miscibilidade do bioativo fundido com o lipídio fundido, a estrutura físico-química e a forma polimórfica da matriz lipídica (MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000). Nos resultados obtidos, é possível observar que inicialmente as partículas com menores concentrações de OB (1,2%) apresentaram valores maiores de concentração de quercetina para quase todas as concentrações de tensoativo, enquanto que as partículas com maiores concentrações de OB (2,8%) apresentaram os menores valores para também quase todas as concentrações de tensoativo. É importante notar também que em relação às partículas com 4,0% de tensoativo, quando foi aumentada a concentração de OB na formulação houve uma redução na capacidade de preservação da quercetina. Este resultado entra em desacordo com o encontrado na literatura, isso porque com o aumento dos MCTs presente nas formulações, espera-se um aumento da solubilidade da quercetina na matriz lipídica, o que provavelmente favoreceria a preservação do bioativo no interior da partícula. Além disso, com o resfriamento da dispersão, a solubilidade poderia ser reduzida e ser ainda mais baixa com o aumento da quantidade de lipídios sólidos (DAS et al., 2011; HUR et al., 2011a; MCCLEMENTS, 2005; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000). Entretanto, devido à composição da matriz lipídica escolhida, o que houve foi uma redução da capacidade de preservação da quercetina com o aumento da concentração de MCTs. Provavelmente devido à

disposição dos tensoativos e dos lipídios na interface, que influencia a facilidade com que há a permeação de oxigênio na partícula.

Tabela 5.1. Resultados de estabilidade da quercetina encapsulada nas partículas lipídicas sólidas quanto à concentração de bioativo. Os resultados são apresentados como as médias e desvios padrões dos valores encontrados para as replicatas de amostras.

Formulação	Concentração de Quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	Dia 0	Dia 7	Dia 15	Dia 20	Dia 30
1,2_2,0	215,2 $\pm$ 24,6 <sup>aA</sup>	187,4 $\pm$ 15,4 <sup>aAB</sup>	178,7 $\pm$ 25,9 <sup>abcB</sup>	180,3 $\pm$ 10,8 <sup>abcdB</sup>	198,0 $\pm$ 19,4 <sup>abcAB</sup>
2,0_2,0	167,9 $\pm$ 29,1 <sup>bcdA</sup>	114,7 $\pm$ 18,7 <sup>efB</sup>	143,7 $\pm$ 22,7 <sup>cdeAB</sup>	134,3 $\pm$ 17,8 <sup>eAB</sup>	105,5 $\pm$ 28,7 <sup>ghB</sup>
2,8_2,0	133,3 $\pm$ 30,9 <sup>dAB</sup>	128,1 $\pm$ 16,9 <sup>cdefAB</sup>	128,4 $\pm$ 16,8 <sup>deAB</sup>	143,8 $\pm$ 18,4 <sup>eA</sup>	102,2 $\pm$ 22,0 <sup>hB</sup>
1,2_2,5	193,3 $\pm$ 16,6 <sup>abcA</sup>	182,3 $\pm$ 22,3 <sup>aA</sup>	181,3 $\pm$ 25,0 <sup>abcA</sup>	182,7 $\pm$ 16,7 <sup>abcA</sup>	192,4 $\pm$ 21,1 <sup>abcdA</sup>
2,0_2,5	182,9 $\pm$ 11,3 <sup>abcA</sup>	122,2 $\pm$ 24,8 <sup>defC</sup>	149,9 $\pm$ 17,0 <sup>bcdABC</sup>	142,7 $\pm$ 22,6 <sup>eBC</sup>	162,6 $\pm$ 24,6 <sup>cdefAB</sup>
2,8_2,5	154,9 $\pm$ 15,7 <sup>cdBC</sup>	167,8 $\pm$ 18,9 <sup>abcB</sup>	138,9 $\pm$ 22,6 <sup>cdeC</sup>	160,8 $\pm$ 11,5 <sup>bcdBC</sup>	207,4 $\pm$ 5,1 <sup>aA</sup>
1,2_3,0	194,8 $\pm$ 8,8 <sup>abcA</sup>	190,7 $\pm$ 17,0 <sup>aA</sup>	193,3 $\pm$ 24,3 <sup>abA</sup>	194,9 $\pm$ 8,6 <sup>aA</sup>	199,8 $\pm$ 16,3 <sup>abA</sup>
2,0_3,0	179,1 $\pm$ 43,9 <sup>abcdA</sup>	103,2 $\pm$ 27,6 <sup>fB</sup>	153,5 $\pm$ 8,1 <sup>abcdeA</sup>	164,7 $\pm$ 13,8 <sup>abcdeA</sup>	161,8 $\pm$ 15,4 <sup>defA</sup>
2,8_3,0	133,5 $\pm$ 31,6 <sup>dA</sup>	156,6 $\pm$ 23,2 <sup>abcdA</sup>	161,4 $\pm$ 55,4 <sup>abcdA</sup>	135,9 $\pm$ 35,6 <sup>eA</sup>	138,3 $\pm$ 30,7 <sup>fgA</sup>
1,2_3,5	206,7 $\pm$ 14,4 <sup>abA</sup>	188,4 $\pm$ 11,6 <sup>aA</sup>	198,7 $\pm$ 27,9 <sup>aA</sup>	184,7 $\pm$ 11,3 <sup>abA</sup>	209,7 $\pm$ 6,7 <sup>aA</sup>
2,0_3,5	169,3 $\pm$ 28,1 <sup>abcdA</sup>	138,2 $\pm$ 35,8 <sup>bcdEFB</sup>	170,8 $\pm$ 11,4 <sup>abcdAB</sup>	197,8 $\pm$ 16,0 <sup>aA</sup>	155,9 $\pm$ 15,9 <sup>efB</sup>
2,8_3,5	179,6 $\pm$ 22,0 <sup>abcdA</sup>	149,9 $\pm$ 26,5 <sup>abcdeABC</sup>	146,5 $\pm$ 14,7 <sup>cdeBC</sup>	134,7 $\pm$ 10,2 <sup>eC</sup>	170,0 $\pm$ 9,2 <sup>bcdEFAB</sup>
1,2_4,0	177,6 $\pm$ 4,5 <sup>abcdA</sup>	171,8 $\pm$ 5,5 <sup>abA</sup>	181,2 $\pm$ 7,9 <sup>abcA</sup>	148,5 $\pm$ 5,7 <sup>deB</sup>	182,4 $\pm$ 10,0 <sup>abcdeA</sup>
2,0_4,0	175,4 $\pm$ 5,4 <sup>abcdA</sup>	189,3 $\pm$ 9,0 <sup>aA</sup>	158,5 $\pm$ 1,5 <sup>abcdeB</sup>	153,7 $\pm$ 16,3 <sup>bcdeB</sup>	158,9 $\pm$ 4,5 <sup>abcdeB</sup>
2,8_4,0	200,3 $\pm$ 22,1 <sup>abcA</sup>	163,4 $\pm$ 4,4 <sup>abcB</sup>	113,5 $\pm$ 8,5 <sup>eC</sup>	151,1 $\pm$ 9,4 <sup>cdeB</sup>	150,7 $\pm$ 6,7 <sup>defB</sup>

As letras minúsculas nas colunas indicam o resultado da análise estatística feita entre diferentes formulações em um mesmo dia, enquanto que as letras maiúsculas nas linhas indicam se houve diferença significativa no período de armazenamento estudado para uma mesma formulação: letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias enquanto que letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre as médias analisadas (procedimento ANOVA, teste Tukey, ( $\alpha=0,05$ )).

Algumas semelhanças entre os perfis temporais da concentração de quercetina nas partículas com a mesma concentração de OB puderam ser observadas e ficam mais evidentes quando observados os gráficos de concentração de quercetina pelo tempo, como mostrado na Figura 5.3.

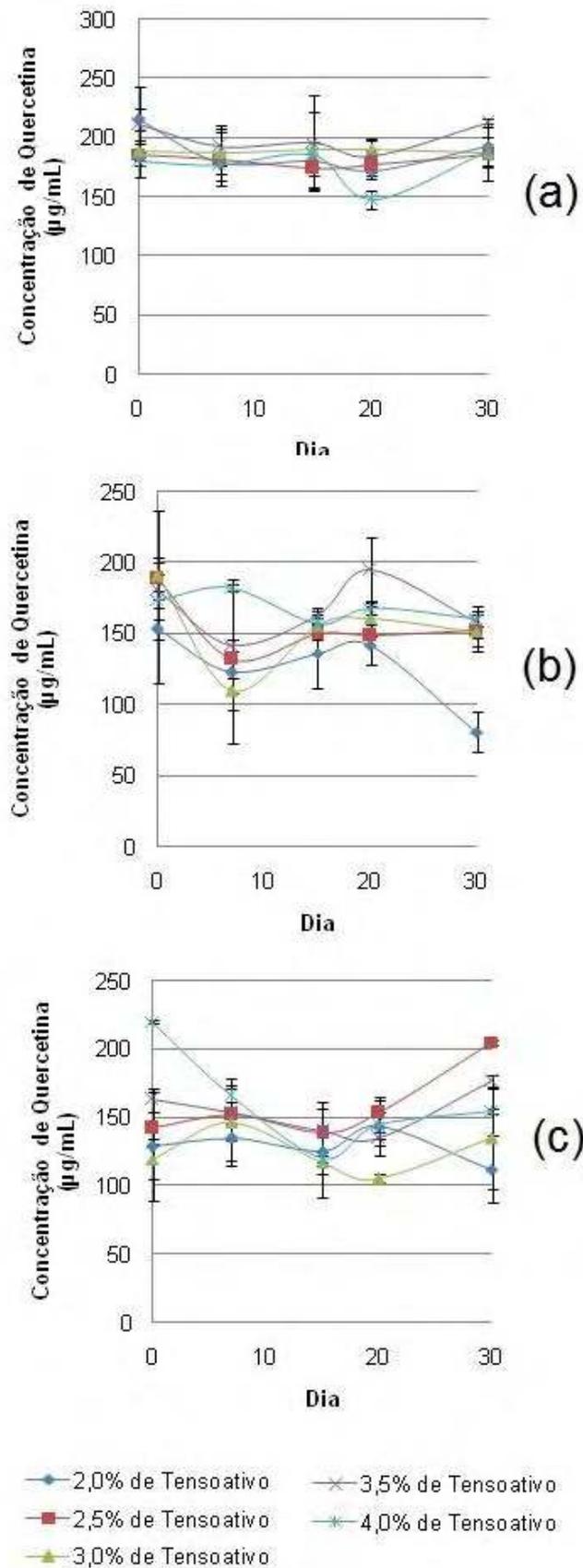


Figura 5.3. Perfis temporais de concentração de quercetina encapsulada nas micropartículas lipídicas sólidas durante 30 dias de armazenamento: (a) 1,2% de óleo de babaçu; (b) 2,0% de óleo de babaçu; (c) 2,8% de óleo de babaçu.

Nota-se que nos primeiros 15 dias de armazenamento as partículas com 2,8% de OB apresentaram uma redução maior na concentração de quercetina extraída se comparadas às outras partículas. Nota-se também que as partículas contendo 1,2% de OB apresentaram uma oscilação menor dos valores de concentração de quercetina durante o mesmo período e essa variação das médias não foi significativa. Isso se deve provavelmente ao fato de que nestas partículas há uma porcentagem maior de LCTs. Estes triacilglicerois cristalizam geralmente nas formas termodinamicamente mais estáveis e, por isso, há uma menor modificação das formas cristalinas ao longo do tempo de armazenamento, o que provavelmente favoreceu a preservação da quercetina no interior da matriz lipídica (MCCLEMENTS, 2012; SOUTO et al., 2011; BUNJES; UNRUH, 2007).

Em relação às partículas produzidas com 2,0% de OB, nos primeiros 7 dias houve uma redução dos valores determinados inicialmente, entretanto, ao final dos 30 dias somente as partículas com 2,0 e 4,0% de tensoativo mantiveram essa redução significativa. Nota-se neste caso, que a porcentagem de tensoativo não influenciou a preservação da quercetina na matriz lipídica, mas sim a composição lipídica. Se comparadas com as partículas contendo 1,2% de OB, o aumento da quantidade de MCTs na formulação reduziu a capacidade de preservação da quercetina. O mesmo efeito pode ser observado em relação às partículas com 2,8% de OB, onde houve uma redução da concentração de quercetina nos primeiros 15 dias de armazenamento, entretanto essa redução só se manteve significativa para a partícula com 4,0% de tensoativo.

Desta forma, foi observado que o aumento da quantidade de MCTs nas formulações não afetou significativamente a capacidade de preservação da quercetina pelas partículas, exceto para as formulações contendo 4,0% de tensoativo onde esse aumento gerou uma redução mais expressiva nos valores determinados durante o período analisado.

Estudos feitos por Bunjes, Koch e Westesen (2003) sugerem que existem interações da camada de tensoativos hidrofóbicos com a matriz lipídica e que a transição polimórfica que ocorre dentro de uma partícula é iniciada na interface e não no núcleo. Como as moléculas de triacilglicerois perto da interface têm energia superior e maior mobilidade do que aquelas totalmente cercadas pela estrutura cristalina de triacilglicerois, estas podem sofrer mais facilmente as alterações

conformacionais necessárias para uma transição. Moléculas de tensoativo adsorvidos na interface podem modificar esse processo. Desta forma, o aumento na concentração de tensoativos utilizada nas formulações pode alterar a forma com que a cristalização e as transições polimórficas ocorrem dentro das partículas. Assim, analisando-se a influência da porcentagem de tensoativo na capacidade de preservação da quercetina pelas formulações, obtêm-se resultados relevantes: No dia zero, as partículas contendo 1,2 e 2,0% de OB não diferiram entre si com o aumento da porcentagem de tensoativo na formulação, entretanto a partícula 2,8\_4,0 apresentou valores de concentração de quercetina significativamente maiores que aquelas do mesmo grupo. No dia 7, as partículas com 1,2% de OB e 2,8% de OB não diferiram daquelas produzidas com a mesma composição lipídica e diferentes porcentagens de tensoativo. Entretanto a partícula 2,0\_4,0 diferiu daquelas com menos tensoativo, apresentando valores significativamente maiores. No dia 15 não houve diferença significativa entre as amostras com a mesma composição lipídica. Aos 20 dias de armazenamento, a partícula 2,0\_3,5 apresentou valores mais altos de concentração de quercetina que aquelas com a mesma composição lipídica e diferentes porcentagens de tensoativo. Por outro lado, a partícula 1,2\_4,0 apresentou valores significativamente mais baixos que aquelas com menores concentrações de tensoativo. Ao final do período analisado, não houve diferença significativa entre as partículas com 1,2% de OB, entretanto as partículas com 2,0 e 2,8% de OB com as menores porcentagens de tensoativo apresentaram os valores mais baixos de concentração de quercetina e significativamente menores que todas as outras formulações. Desta forma, para as partículas contendo 1,2% de OB, a porcentagem de tensoativo não influenciou na capacidade de preservação da quercetina e provavelmente não alterou a forma com que ocorrem as transições polimórficas dentro das partículas (BUNJES; KOCH; WESTESEN., 2003).

É importante notar que, de uma forma geral, o aumento da quantidade de OB nas formulações reduziu os valores de concentração de quercetina, isso para todas as porcentagens de tensoativo, durante todo o período de armazenamento. Uma possível explicação para este resultado é que a concentração de MCTs presente na formulação pode alterar a forma em que a quercetina se localiza no interior das partículas, bem como a permeabilidade do oxigênio. Desta forma, o aumento da concentração de OB nas partículas pode ter contribuído para facilitar a

oxidação da quercetina encapsulada, porém, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

As dispersões de micropartículas foram analisadas também em relação ao seu diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula, ao longo do tempo de armazenagem.

A distribuição de tamanho de partícula representa a fração de partículas em diferentes classes de tamanho e pode ser controlada pela seleção adequada dos componentes da dispersão e pelas condições de produção (LESMESS; MCCLEMENTS, 2009; MCCLEMENTS, 2005). Os resultados obtidos para as partículas contendo 2% de tensoativo são utilizados como exemplificação dos resultados obtidos e estão representados na Figura 5.4.

Como pode ser observado, foram obtidos gráficos bimodais que indicam a existência de duas populações distintas. A polidispersidade dos gráficos é alta e os picos se modificaram com o tempo em ambos os eixos. Essas modificações foram observadas em todos os gráficos de distribuição para todas as formulações e não indicam a desestabilização do sistema, mas sim a heterogeneidade dos diâmetros encontrados na dispersão obtida. Este resultado já era esperado, pois se trata de uma característica intrínseca do método de produção utilizado e das partículas lipídicas sólidas como descrito por Mehnert e Mäder (2001). Desta forma, optou-se por não avaliar os gráficos de distribuição de partícula em relação à estabilidade das partículas, mas somente como indicativo da heterogeneidade do sistema.

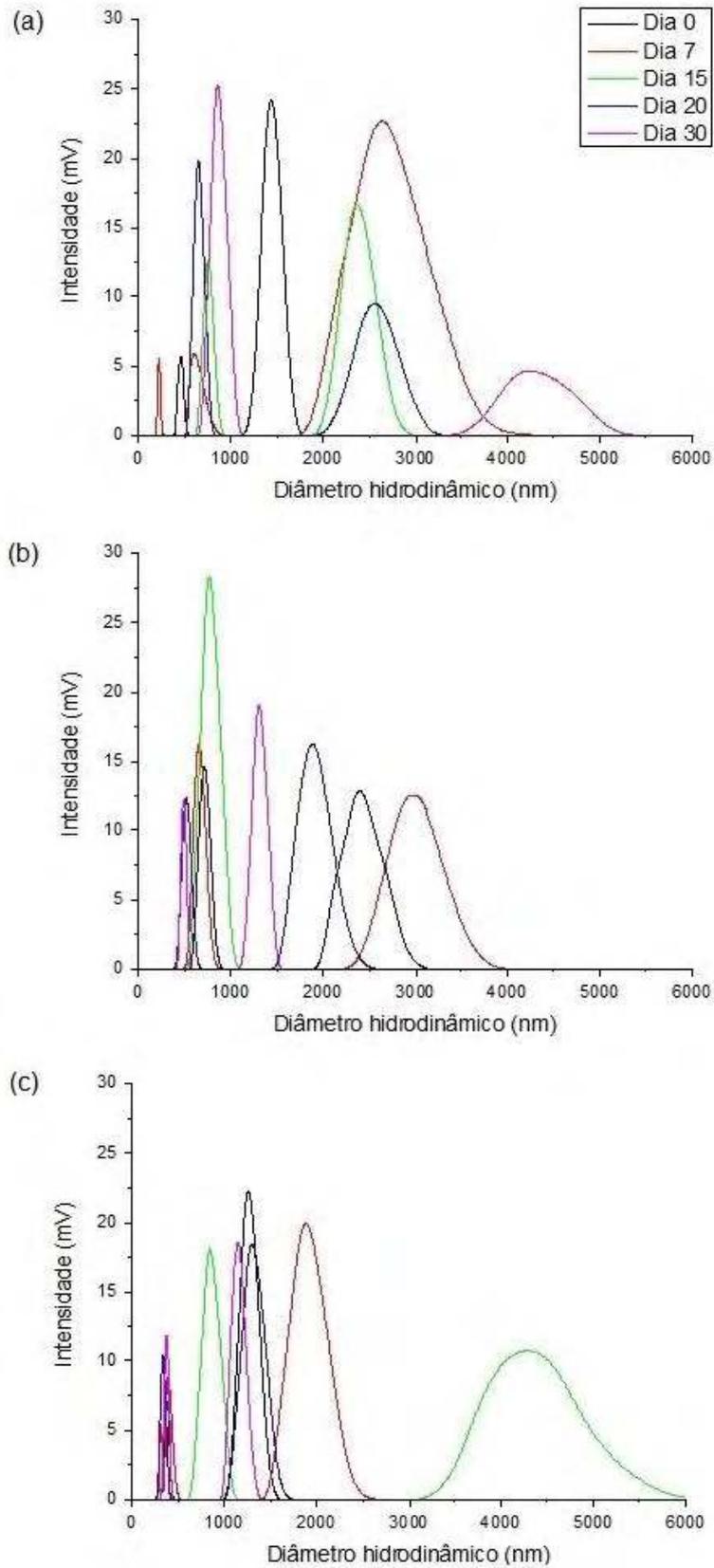


Figura 5.4. Resultados de estabilidade quanto à distribuição de tamanho de partícula para as formulações contendo 2% de tensoativo e 1,2% (a), 2,0% (b) e 2,8% (c) de óleo de babaçu.

Os resultados de diâmetro hidrodinâmico médio são representados na Tabela 5.2. Foram obtidos diâmetros que variaram de aproximadamente 700 nm a 1800 nm para as diferentes formulações. Os diâmetros mais elevados foram encontrados nas formulações contendo 2,0 e 2,5% de tensoativo enquanto que os valores mais baixos foram encontrados nas formulações contendo 3,5 e 4,0% de tensoativo. Estes resultados também já eram esperados uma vez que o aumento na concentração de tensoativos em uma dispersão reduz o tamanho das partículas devido à redução da tensão superficial no momento da homogeneização, como descrito por outros autores, bem como aumenta o empacotamento na interface (DAS et al., 2011; MEHNERT; MADER, 2001).

Diâmetros maiores também foram obtidos com o aumento da concentração de LCTs nas formulações. Esse aumento pode ser atribuído à viscosidade da fase dispersa. LCTs têm uma viscosidade relativamente superior aos MCTs, e, portanto, a separação das partículas durante a homogeneização se torna menos eficiente com o aumento da quantidade de LCTs, levando a partículas com diâmetros médios maiores (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013; HUR et al., 2011a; MCCLEMENTS, 2005).

Foi realizada a análise estatística dos dados obtidos a fim de avaliar se houve diferença significativa entre os diâmetros obtidos durante o período analisado para uma mesma amostra, e também entre as amostras em um mesmo dia. Os resultados também são mostrados na Tabela 5.2.

Os resultados da análise estatística demonstram que apenas as dispersões 1,2\_4,0 e 2,0\_4,0 apresentaram redução significativa no diâmetro médio de partícula após 30 dias de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com os discutidos anteriormente para preservação da quercetina, onde foi mencionado que para as partículas com 4,0% de tensoativo, quando há o aumento da concentração de OB nas formulações, há uma redução na capacidade de preservação da quercetina.

Tabela 5.2. Resultados de estabilidade da quercetina encapsulada nas partículas lipídicas sólidas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio. Médias e desvios padrões dos diâmetros encontrados.

Formulação	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)				
	Dia 0	Dia 7	Dia 15	Dia 20	Dia 30
1,2_2,0	1583,5±182,8 <sup>aA</sup>	1726,7±5,1 <sup>abA</sup>	1525,6±129,3 <sup>abA</sup>	1331,3±135,7 <sup>abA</sup>	1315,1±82,6 <sup>abA</sup>
2,0_2,0	1418,2±281,9 <sup>abcA</sup>	1357,3±260,2 <sup>bcdA</sup>	1281,8±160,4 <sup>abcdA</sup>	1217,9±34,6 <sup>abcA</sup>	1379,6±118,2 <sup>abA</sup>
2,8_2,0	1225,5±17,6 <sup>abcA</sup>	946,8±147,8 <sup>efgA</sup>	1527,9±232,1 <sup>abA</sup>	1275,1±190,2 <sup>abA</sup>	1251,3±31,0 <sup>abcA</sup>
1,2_2,5	1253,9±36,1 <sup>abcAB</sup>	1125,9±40,3 <sup>defgB</sup>	1219,9±60,5 <sup>abcdAB</sup>	1392,5±106,9 <sup>abA</sup>	1197,7±25,8 <sup>abcdAB</sup>
2,0_2,5	1391,3±80,1 <sup>abcBC</sup>	1287,9±102,2 <sup>cdeC</sup>	1690,8±71,8 <sup>aA</sup>	1591,4±58,9 <sup>aAB</sup>	1433,7±42,6 <sup>aABC</sup>
2,8_2,5	1342,3±39,2 <sup>abcA</sup>	1052,4±59,6 <sup>defgA</sup>	1275,3±77,4 <sup>abcdA</sup>	1171,9±175,4 <sup>abcdA</sup>	1168,2±378,2 <sup>abcdA</sup>
1,2_3,0	1381,9±234,3 <sup>abcA</sup>	1025,9±41,5 <sup>defgA</sup>	1023,7±83,2 <sup>cdeA</sup>	1189,1±88,4 <sup>abcdA</sup>	1086,0±98,3 <sup>abcdA</sup>
2,0_3,0	1154,9±75,6 <sup>abcA</sup>	1195,0±68,5 <sup>defA</sup>	1389,0±199,6 <sup>abcA</sup>	1342,9±102,3 <sup>abA</sup>	1320,9±69,5 <sup>abA</sup>
2,8_3,0	1156,2±239,3 <sup>abcA</sup>	947,3±19,4 <sup>efgA</sup>	868,1±98,4 <sup>deA</sup>	1047,8±94,4 <sup>bcdA</sup>	919,8±89,0 <sup>bcdA</sup>
1,2_3,5	1053,6±78,6 <sup>abcA</sup>	880,1±14,2 <sup>fgA</sup>	917,3±92,7 <sup>cdeA</sup>	1072,7±57,1 <sup>bcdA</sup>	1039,1±57,4 <sup>abcdA</sup>
2,0_3,5	1391,0±191,7 <sup>abcA</sup>	904,7±123,1 <sup>fgB</sup>	1144,1±12,4 <sup>bcdAB</sup>	1130,5±107,8 <sup>bcdAB</sup>	1078,8±12,0 <sup>abcdAB</sup>
2,8_3,5	977,6±104,7 <sup>bcA</sup>	774,2±41,4 <sup>gA</sup>	858,3±75,3 <sup>deA</sup>	851,1±33,0 <sup>cdeA</sup>	747,4±101,8 <sup>dA</sup>
1,2_4,0	1470,5±14,9 <sup>abA</sup>	1807,0±25,5 <sup>aA</sup>	1526,5±222,7 <sup>abA</sup>	785,0±128,7 <sup>deA</sup>	967,0±15,6 <sup>bcdB</sup>
2,0_4,0	1534,0±49,5 <sup>abA</sup>	1617,5±36,1 <sup>abcA</sup>	1596,0±7,1 <sup>abA</sup>	732,0±1,4 <sup>eB</sup>	823,0±29,7 <sup>cdB</sup>
2,8_4,0	875,5±0,7 <sup>cBC</sup>	947,5±31,8 <sup>efgB</sup>	702,5±14,9 <sup>dE</sup>	1123,5±85,6 <sup>bcdA</sup>	762,0±1,4 <sup>dCD</sup>

As letras minúsculas nas colunas indicam o resultado da análise estatística feita entre diferentes formulações em um mesmo dia, enquanto que as letras maiúsculas nas linhas indicam se houve diferença significativa no período de armazenamento estudado para uma mesma formulação: letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias enquanto que letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre as médias analisadas (procedimento ANOVA, teste Tukey, ( $\alpha=0,05$ )).

Em relação às diferenças entre as formulações para um mesmo dia estudado, no dia zero não houve diferença significativa entre as amostras que continham a mesma porcentagem de OB em sua formulação. Isto significa que, apesar do aumento da concentração de tensoativo nas formulações ter reduzido o tamanho das partículas, esta redução não foi significativa. Ao final dos 30 dias de armazenamento, as partículas contendo 1,2% de OB continuaram não diferindo entre si em relação ao diâmetro médio. Entretanto, para as partículas contendo 2,0% de OB, 4,0% de tensoativo na formulação resultou em diâmetros significativamente menores quando comparadas com aquelas produzidas com menos tensoativo, e para as formulações contendo 2,8% de OB, essa mesma redução foi observada quando utilizado acima de 3,0% de tensoativo. Portanto, com o aumento da proporção de MCTs presentes na formulação, quando há um

aumento também da quantidade de tensoativo utilizado, ocorre a redução do tamanho da partícula. Inúmeros fatores influenciam a cristalização dos lipídicos e conseqüentemente o diâmetro médio das partículas lipídicas sólidas como a formulação, o tipo de bioativo, os fatores de produção (temperatura, homogeneização), a fase contínua, as condições de armazenamento e a composição lipídica (HEURTAULT et al., 2003). A redução observada provavelmente se deve às características de interação dos tensoativos com a matriz lipídica e é influenciada pelas concentrações destes compostos nas formulações. A redução do diâmetro pelo aumento da porcentagem de tensoativo é amplamente difundida. Além disso, a redução do diâmetro da partícula com o aumento da concentração de MCTs nas formulações também já foi observada em outros estudos como o realizado por Salvia-Trujillo et al. (2013) para nanoemulsões e também por Yang e McClements (2013) para emulsões óleo em água.

Através da Figura 5.5 é possível observar que no período analisado houve uma oscilação no diâmetro das partículas. Esta oscilação se deve principalmente ao tempo necessário para estabilização do sistema e também às variações causadas entre as alíquotas coletadas para análise, uma vez que, como mencionado anteriormente, há uma grande heterogeneidade das partículas formadas. Entretanto, pode também ser observado que os valores ao final do período analisado não foram reduzidos para a maioria das partículas produzidas, o que indica estabilidade do sistema coloidal.

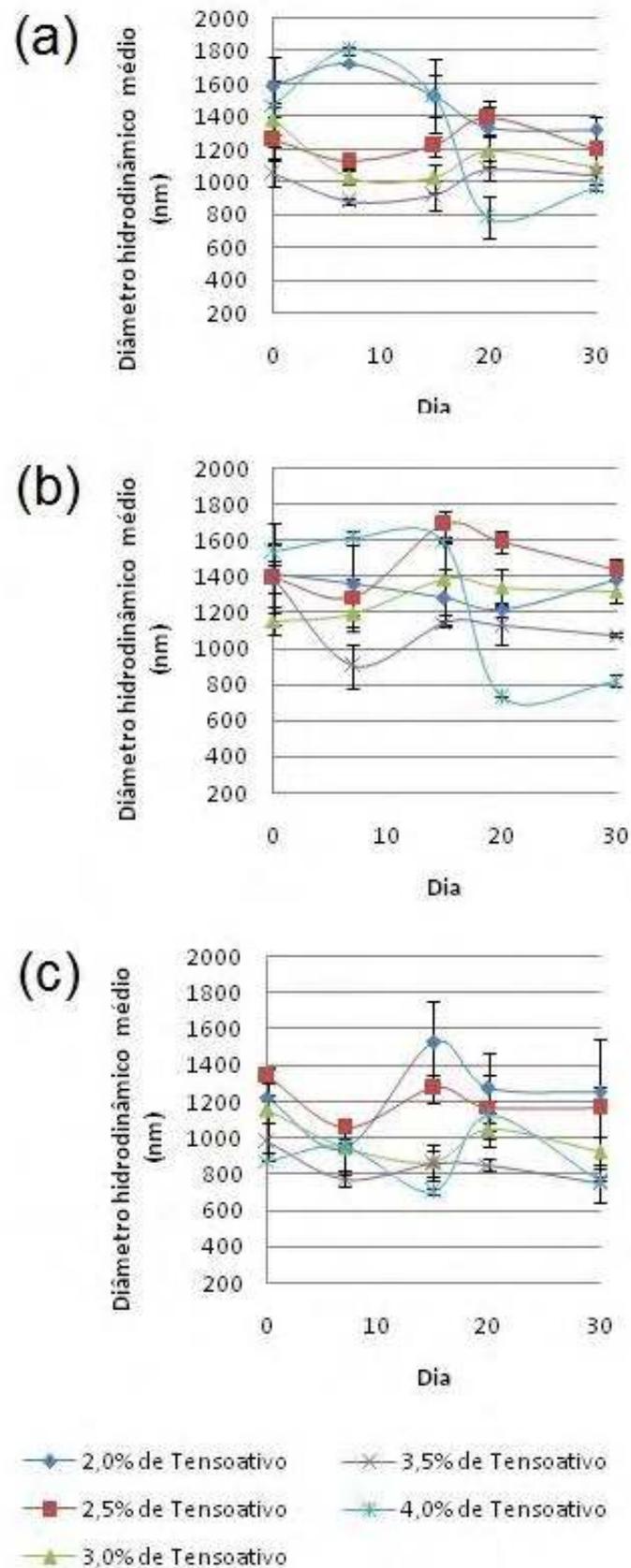


Figura 5.5. Perfis temporais de diâmetro hidrodinâmico médio das micropartículas lipídicas sólidas durante 30 dias de armazenamento: (a) 1,2% de óleo de babaçu; (b) 2,0% de óleo de babaçu; (c) 2,8% de óleo de babaçu.

O potencial zeta representa a carga elétrica “líquida” sobre a superfície de uma partícula coloidal em um meio líquido e é um parâmetro útil para avaliar a estabilidade física de sistemas coloidais. Este valor de carga de superfície é útil para a compreensão das interações entre as partículas dispersas. Manipulando o potencial zeta é possível aumentar a estabilidade da dispersão ou acelerar a floculação das partículas. O potencial zeta utiliza a técnica de espalhamento de luz onde a mobilidade eletroforética das partículas é detectada através de um campo elétrico aplicado. A carga na superfície de uma partícula influencia o ambiente iônico na região próxima à superfície da partícula. Este ambiente iônico é tipicamente descrito utilizando um modelo de dupla camada: a camada de Stern na qual os íons estão firmemente ligados à superfície da partícula, e a camada difusa que fica mais longe da superfície da partícula, contudo, os íons presentes nesta camada ainda são movidos juntos com a partícula. O limite entre a dupla camada elétrica e os íons em equilíbrio na solução é chamado de plano de cisalhamento. O potencial zeta é definido como o potencial medido em mV da distância entre o plano de cisalhamento e a superfície da partícula. Para medir o potencial zeta de uma partícula, uma pequena quantidade de amostra é colocada numa cubeta contendo dois eletrodos que são usados para criar um campo elétrico induzido. Uma vez que o campo elétrico é aplicado, as partículas movem-se em direção ao ânodo ou ao cátodo, se as superfícies estão carregadas positivamente ou negativamente respectivamente. A direção do movimento indica a carga positiva versus a carga negativa e a velocidade do movimento das partículas é utilizada para calcular a magnitude da carga (HORIBA INSTRUMENTS, INC., 2012; DAS et al., 2011).

Os valores de potencial zeta das partículas contendo 4,0% de tensoativo foram avaliados durante 90 dias como indicativo de estabilidade dos sistemas. Os resultados médios são apresentados na Tabela 5.3 junto com a análise estatística feita sobre os dados obtidos.

Tabela 5.3. Resultados e análise estatística para potencial zeta das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina contendo 4,0% de tensoativo na formulação durante 90 dias de armazenamento.

Formulação	Potencial Zeta (mV)			
	Dia 0	Dia 7	Dia 60	Dia 90
1,2_4,0	-18,4±1,2 <sup>aA</sup>	-27,6±5,1 <sup>abAB</sup>	-22,5±3,2 <sup>aAB</sup>	-28,5±3,7 <sup>aB</sup>
2,0_4,0	-12,7±3,8 <sup>aA</sup>	-31,0±1,9 <sup>bC</sup>	-22,7±1,5 <sup>aB</sup>	-23,0±2,7 <sup>aB</sup>
2,8_4,0	-25,6±0,9 <sup>bA</sup>	-19,5±2,4 <sup>aA</sup>	-25,2±3,2 <sup>aA</sup>	-25,1±2,8 <sup>aA</sup>

As letras minúsculas nas colunas indicam o resultado da análise estatística feita entre diferentes formulações em um mesmo dia, enquanto que as letras maiúsculas nas linhas indicam se houve diferença significativa no período de armazenamento estudado para uma mesma formulação: letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias enquanto que letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre as médias analisadas (procedimento ANOVA, teste Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Os resultados indicam que houve diferença significativa entre as amostras apenas nos primeiros sete dias de armazenamento sendo que no primeiro dia, a partícula com mais OB apresentou valores mais negativos, o que não foi reproduzido no dia 7 onde as partículas com 2,0% de OB apresentaram os menores valores. Nos dias posteriores a diferença entre os valores encontrados reduziu e deixou de ser significativa. A diferença entre o potencial zeta do dia 0 e do dia 90 não foi significativa apenas para a formulação com 2,8% de OB que não apresentou alterações significativas durante todo o período estudado.

De uma forma geral, a agregação das partículas é mais difícil de ocorrer para partículas carregadas (altos valores de potencial zeta) devido à repulsão eletrostática (MÜLLER; MADER; GOHLA et al., 2000). Dessa forma, apesar de serem observadas algumas alterações significativas, os valores encontrados para todas as formulações durante todo o período analisado estão na faixa de -12,00 e -32,00 mV que indicam que todos os sistemas coloidais testados se apresentaram estáveis durante todo o período de armazenamento e estão de acordo com os valores encontrados na literatura (ADITYA et al., 2014; LI et al., 2009).

Assim, é possível inferir que todos os sistemas coloidais analisados se apresentaram estáveis no período de 30 dias, mesmo apresentando alguma diferença significativa entre os valores encontrados no período inicial de armazenagem.

### 5.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A fim de analisar a morfologia das partículas produzidas, foram obtidas imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação 1,2\_4,0 (Figura 5.6).

As imagens obtidas confirmam os resultados obtidos nas análises de distribuição de tamanho de partícula e diâmetro médio, uma vez que há uma grande variação na forma e nos tamanhos das partículas (MEHNERT; MÄDER, 2001).

Como pode ser observado, há uma frequência maior de partículas com diâmetros menores e esféricas (Figura 5.6 (a)), entretanto há também a formação de partículas fusiformes com tamanhos variados e aglomerados, como pode ser observado na Figura 5.6 (c) e (d).

Esta variação nas formas das partículas gera uma dificuldade na determinação do diâmetro médio, uma vez que os equipamentos utilizados para tal determinação fazem uso de padrões esféricos para comparação e determinação do diâmetro (MEHNERT; MÄDER, 2001; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000). Como já mencionado anteriormente, essas variações tanto no tamanho quanto na forma das partículas são características das partículas lipídicas sólidas. Durante o armazenamento, podem também ocorrer transformações polimórficas que são acompanhadas por alterações na forma das partículas, designadamente das formas esféricas ( $\alpha$ ) para as formas achatadas ( $\beta$ ) (DAS et al., 2011; SOUTO et al., 2011; MÜLLER; MADER; GOHLA, 2000; MEHNERT; MÄDER, 2001).

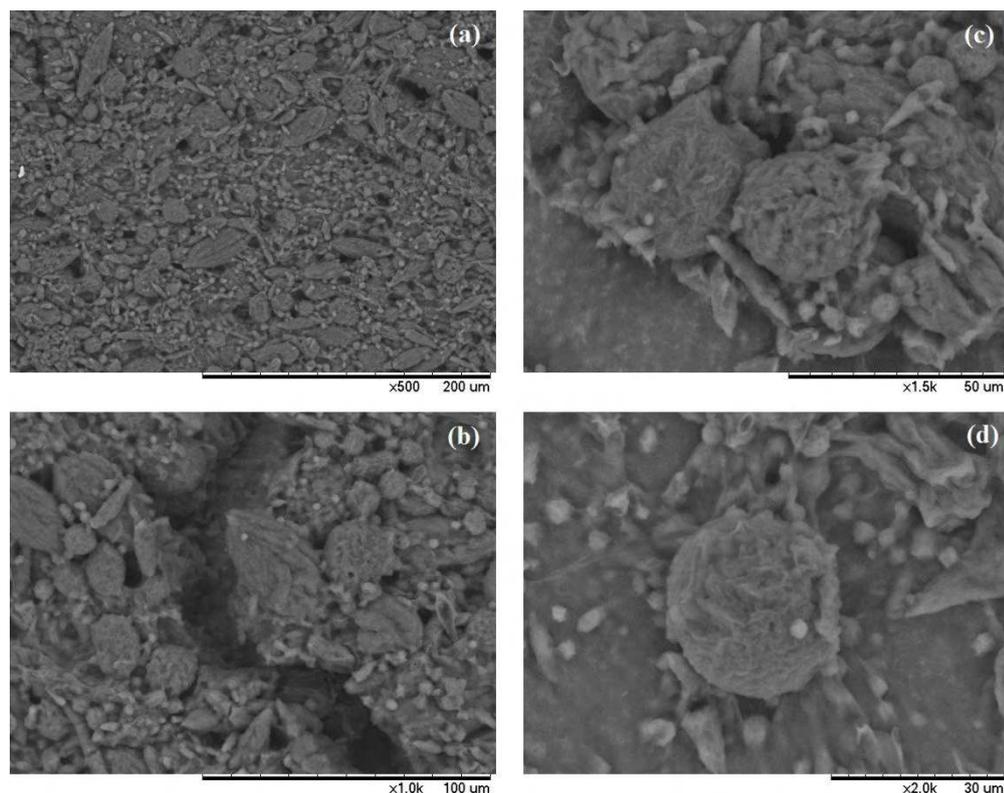


Figura 5.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas com 1,2% de óleo de babaçu e 4% de tensoativo: (a) aumento de 500 vezes; (b) aumento de 1000x; (c) aumento de 1500x; (d) aumento de 2000x.

### 5.2.3. Comportamento térmico

A Figura 5.7 mostra os termogramas obtidos por DSC para as partículas produzidas com óleo de babaçu e triestearina com quercetina encapsulada e a Tabela 5.4 os dados calorimétricos obtidos para tais partículas.

Tabela 5.4. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das partículas lipídicas sólidas contendo óleo de babaçu e triestearina com quercetina encapsulada.

Formulação	$T_{m1}$ (°C)	$T_{onset1}$ (°C)	$\Delta H_{m1}$ (J/g)	$T_{m2}$ (°C)	$T_{onset2}$ (°C)	$\Delta H_{m2}$ (J/g)
1,2_2,0	28,54	25,03	0,136	56,99	40,78	4,751
1,2_4,0	30,41	26,16	0,250	54,92	47,58	4,831
2,0_2,0	29,61	26,00	0,165	60,76	51,99	2,623
2,0_4,0	27,88	17,82	0,610	55,29	46,05	3,235
2,8_2,0	23,69	13,07	2,041	60,09	42,10	1,178
2,8_4,0	29,81	25,21	0,986	55,37	43,66	0,933

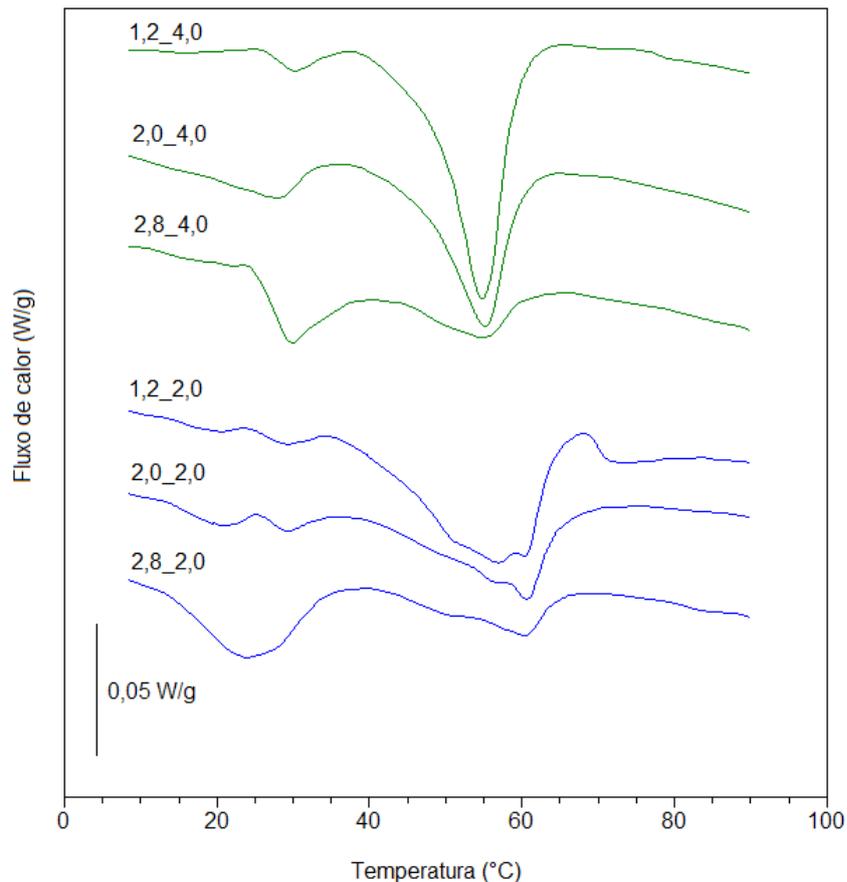


Figura 5.7. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura.

Em experimentos realizados previamente a este trabalho, foram determinadas por DSC as temperaturas de fusão da triestearina e do óleo de babaçu que foram de 60°C e 25,5°C respectivamente, o que está de acordo com o valor mencionado por Gumiero e Rocha-Filho (2012), que para o óleo de babaçu é próximo a 30°C.

A presença do óleo de babaçu e da triestearina transparece nos termogramas uma vez que estes possuem duas transições de fase endotérmicas (dois processos de fusão), sendo um próximo a 30°C e outro próximo a 60°C. Como esperado, com o aumento da quantidade de óleo de babaçu nas formulações, a entalpia de fusão da porção de baixo ponto de fusão aumenta. Por outro lado, a entalpia da porção lipídica de alto ponto de fusão diminui. Isso tanto para as partículas com 2 ou 4% de tensoativo.

Estas variações na entalpia de fusão e as alterações nas temperaturas máximas e *onset* indicam que houve perturbações significativas na estrutura da

partícula com a adição de MCTs à formulação, que aumentou a heterogeneidade a matriz lipídica da partícula. Este fato é extremamente desejável, uma vez que matrizes lipídicas heterogêneas são interessantes para a produção de micropartículas lipídicas sólidas, pois esta desordem favorece a inclusão de moléculas durante o processo de encapsulação, e diminuem a chance de expulsão dos bioativos, sendo também possível controlar melhor a liberação dos mesmos (SILVA et al., 2014; DAS; CHAUDHURY, 2011; SEVERINO et al., 2011; MÜLLER et al., 2002).

Outro fato que pode ser observado é que o aumento da porcentagem de tensoativo nas formulações gerou uma melhor definição das curvas dos termogramas. Possivelmente este fato ocorreu devido à capacidade dos tensoativos de empacotar a interface da partícula e dessa forma, modificar a transição de fases das moléculas lipídicas, alterando assim a forma com que as partículas irão fundir ou cristalizar (BUNJES; KOCH; WESTESEN, 2003).

### **5.3. AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ENCAPSULANDO QUERCETINA**

#### **5.3.1. Determinação das atividades das enzimas utilizadas e preparação das soluções enzimáticas e biliar.**

Vários fatores como as características da amostra, as atividades enzimáticas, a composição iônica, as tensões mecânicas aplicadas e os tempos de digestão têm influências significativas sobre os resultados dos métodos de digestibilidade *in vitro* (HUR et al., 2011b). Um estudo realizado por Boisen e Eggum (1991) definiu a relação existente entre a digestão *in vitro* e atividade enzimática. Eles relataram que as técnicas *in vitro* podem utilizar enzimas específicas ou selecionadas para atingir valores de digestibilidade máximos ou ainda para medir a velocidade inicial da hidrólise. Os fatores mais importantes para um sistema de digestão *in vitro* são as características da enzima como a concentração, temperatura, pH, estabilidade, ativadores, inibidores, e tempo de incubação. Esses fatores podem afetar as atividades enzimáticas (HUR et al., 2011b). Dessa forma, as atividades das enzimas utilizadas neste trabalho foram determinadas segundo a exigência do método descrito por Minekus et al. (2014).

Para a determinação da atividade da pepsina, foram realizados testes preliminares para determinação da concentração inicial das soluções enzimáticas a serem testadas. Assim, foram escolhidas as concentrações de 20, 30, 40, 50, 60 e 70  $\mu\text{g/mL}$ . A atividade de pepsina foi calculada através da leitura das absorbâncias a 280 nm após 10 minutos de reação das soluções enzimáticas com a hemoglobina. O experimento foi realizado em triplicata e os valores obtidos estão descritos na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Atividades enzimáticas determinadas para a pepsina

Concentração da solução de pepsina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentração de pepsina na cubeta ( $\text{mg/ml}$ )	Atividade enzimática determinada ( $\text{U/mg}$ )			Média e desvio padrão
		1	2	3	
20	0,00125	5200	4320	7120	5547 $\pm$ 1432
30	0,001875	3413	3520	4960	3964 $\pm$ 864
40	0,0025	4120	3280	2920	3440 $\pm$ 616
50	0,003125	2048	1504	2112	1888 $\pm$ 334
60	0,00375	1760	2667	1920	2116 $\pm$ 484
70	0,004375	1531	1371	1783	1562 $\pm$ 207

Conforme demonstrado na Tabela 5.5, a variação dos valores das médias das atividades determinadas foi alta e o mesmo foi observado para os valores de desvio padrão determinados. Desta forma admitiu-se que os valores obtidos não foram confiáveis e optou-se por assumir a atividade enzimática (2500  $\text{U/mg}$ ) descrita no rótulo do fabricante (Sigma-Aldrich), uma vez que o substrato utilizado para determinação da atividade pelo fabricante é o mesmo que o descrito no procedimento utilizado.

Para a determinação da atividade de lipase, foi utilizado o método pH-Stat e tributirina como substrato (MINEKUS et al., 2014). Os ensaios foram realizados em triplicata e a solução enzimática na concentração de 1  $\text{mg/mL}$ . Os resultados estão descritos na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Atividades enzimáticas determinadas para a lipase pancreática.

Volume* (ml)	Atividade enzimática (U/mg)
0.1	8409
0.1	5810
0.1	4395
0.15	4606
0.15	6043
0.15	6353

\* volume de solução enzimática inserido no béquer para reação.

Apesar da variação nos valores determinados para atividade da lipase, optou-se por assumir o valor da média dos valores determinados (5650 U/mg) como a atividade final determinada a ser utilizada para os cálculos da quantidade de enzima a ser inserida nos ensaios de digestibilidade *in vitro*.

Neste experimento foi determinada a atividade de tripsina da pancreatina para utilização nos cálculos posteriores pelo método espectrofotométrico descrito na metodologia já citada no item 4.2.3.1 da seção “MATERIAIS e MÉTODOS” para determinação da taxa de reação (absorbância/ min) e TAME como substrato. Foram utilizadas soluções enzimáticas nas concentrações de 1,0 e 0,5 mg/ml e os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados são mostrados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Atividades enzimáticas determinadas para a pancreatina

	Concentração da solução enzimática					
	1 mg/ml			0,5 mg/ml		
Replicata	1	2	3	1	2	3
Inclinação (absorbância/min)	0.09	0.11	0.1	0.06	0.05	0.06
Atividade enzimática (U/mg)	5.03	6.25	5.51	6.21	6.05	6.16

Os resultados para a pancreatina foram reprodutíveis e, portanto, assumiu-se a média dos valores determinados (5,87 U/mg) como o valor resultante da determinação.

A partir destas determinações foi possível calcular a quantidade de enzima necessária para preparação das soluções enzimáticas utilizadas nos experimentos de digestibilidade *in vitro* com as atividades adequadas conforme descrito no procedimento estabelecido por Minekus et al. (2014). Assim, foram utilizadas as seguintes soluções:

- Solução de pepsina: 100 mg de pepsina solubilizados em 10 ml de solução de eletrólitos da fase gástrica.
- Solução de pancreatina: 1,36g de pancreatina solubilizados em 10 ml solução de eletrólitos da fase intestinal.
- Solução de lipase: 44,25mg de lipase pancreática solubilizados em 10 ml solução de eletrólitos da fase intestinal.

A concentração de sais de bile no extrato utilizado não foi determinada em nosso laboratório. Entretanto, houve a colaboração de um pesquisador do Departamento de Ciências dos Alimentos da University of Guelph (Canadá), envolvido com ensaios idênticos, que realizou esta determinação conforme requerido no procedimento descrito por Minekus et al. (2014). O resultado obtido foi o de 1,34 mmol/g de extrato de bile. Desta forma, foi preparado para os ensaios de digestibilidade *in vitro* soluções contendo 1,194 g de extrato de bile solubilizados em 10 ml de água ultrapura.

### **5.3.2. Monitoramento das modificações das micropartículas lipídicas durante a digestão *in vitro* simulada**

Após a determinação das atividades das enzimas e da concentração de sais de bile no extrato de bile a serem utilizados, iniciaram-se os ensaios de digestibilidade *in vitro* simulada como descrito no item 4.2.3.3 da seção “Materiais e Métodos”.

Devido a não haver diferenças significativas de estabilidade entre as amostras produzidas com diferentes concentrações de tensoativo, optou-se por realizar os ensaios de digestibilidade apenas com as dispersões com 2,0 e 4,0% de tensoativo, a fim de verificar se há diferenças significativas no processo de digestão das partículas, e se a liberação da quercetina é dificultada pelo aumento da concentração destes compostos nas formulações. Além disso, também era objetivo obter dados sobre a influência de MCTs nas dispersões no processo de digestão e sobre a bioacessibilidade da quercetina encapsulada.

Segundo McClements (2013), o tamanho médio das partículas de uma dispersão pode ser alterado consideravelmente à medida que esta passa através do trato gastrointestinal, devido a vários motivos:

- (i) Floculação - as partículas podem se associar mantendo suas integridades individuais;
- (ii) Coalescência - partículas líquidas podem fundir-se para formar uma partícula maior;
- (iii) Coalescência parcial - partículas parcialmente cristalinas podem se fundir e formar aglomerados;
- (iv) Maturação de Ostwald - partículas grandes podem crescer e partículas pequenas encolher devido à difusão de moléculas de óleo através da fase contínua;
- (v) Digestão - uma partícula pode encolher devido à degradação enzimática e liberação de produtos de digestão;
- (vi) Solubilização – as partículas podem encolher devido à transferência de algumas das moléculas de lipídios para a fase contínua.

Portanto, é importante monitorar as mudanças no tamanho e na estrutura das partículas lipídicas ao longo do trato gastrointestinal. Dessa forma, imediatamente antes do início dos ensaios, o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas foi determinado e durante todo o experimento, que durou 180 minutos, (60 minutos da fase gástrica + 120 minutos da fase intestinal) o diâmetro foi acompanhado a cada 20 minutos. Entretanto, assumiram-se somente os valores iniciais e finais da fase gástrica e os valores iniciais, após 60 minutos e finais da fase intestinal como relevantes para o estudo.

Foi avaliado se houve diferença significativa do diâmetro hidrodinâmico médio durante todo o período de digestão e a cada tempo de digestão entre as formulações. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Resultados de diâmetro hidrodinâmico médio para digestibilidade *in vitro* simulada das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina.

Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)					
Formulação	Fase gástrica		Fase intestinal		
	0 min	60 min	0 min	60 min	120 min
1,2_4,0	1312±154,6 <sup>abB</sup>	2235±342,2 <sup>aA</sup>	1213±173,7 <sup>abB</sup>	1013±294,3 <sup>abB</sup>	816±48,6 <sup>abB</sup>
1,2_2,0	1521±120,9 <sup>aA</sup>	1567±345,9 <sup>abA</sup>	1375±122,0 <sup>abA</sup>	1158±130,4 <sup>abA</sup>	1043±192,3 <sup>abA</sup>
2,0_4,0	1193±97,3 <sup>abA</sup>	903±115,8 <sup>bcB</sup>	836±71,4 <sup>bBC</sup>	601±103,7 <sup>bC</sup>	533±64,4 <sup>bcC</sup>
2,0_2,0	1315±116,1 <sup>aA</sup>	1532±472,0 <sup>abA</sup>	1390±81,7 <sup>aA</sup>	1248±121,0 <sup>aA</sup>	1083±21,6 <sup>aA</sup>
2,8_4,0	923±47,0 <sup>bA</sup>	557±53,5 <sup>cB</sup>	908±221,3 <sup>bA</sup>	581±104,2 <sup>bB</sup>	488±50,6 <sup>cB</sup>
2,8_2,0	1161±229,3 <sup>abAB</sup>	656±228,9 <sup>cB</sup>	1379±125,7 <sup>aA</sup>	1155±309,3 <sup>aAB</sup>	969±185,2 <sup>aAB</sup>

As letras minúsculas nas colunas indicam o resultado da análise estatística feita entre diferentes amostras em um mesmo tempo de digestão, enquanto que as letras maiúsculas nas linhas indicam se houve diferença significativa no tempo de digestão estudado para uma mesma amostra: letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias enquanto que letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre as médias analisadas (procedimento ANOVA, teste Tukey, ( $\alpha=0,05$ )).

É possível observar que inicialmente não houve diferença significativa entre os diâmetros encontrados para as amostras contendo a mesma composição lipídica e diferentes porcentagens de tensoativo. Entretanto, notou-se a redução do diâmetro inicial para todas as partículas produzidas com maiores porcentagens de tensoativo. Este resultado está de acordo com aqueles mostrados nos ensaios de estabilidade, conforme mostrados no item 5.2.1.

O comportamento do diâmetro é dependente da composição e da estrutura inicial das partículas (MCCLEMENTS, 2013). O efeito destas características pôde ser observado nos resultados obtidos, uma vez que as partículas apresentaram variações em relação ao diâmetro médio distintas durante os ensaios de digestibilidade.

É possível notar que com o aumento da quantidade de MCTs nas formulações, houve uma alteração no comportamento das partículas na fase gástrica, uma vez que as partículas produzidas com 1,2% de OB aumentaram de tamanho, enquanto que aquelas produzidas com 2,8% de OB diminuíram.

Segundo Golding et al. (2013), as emulsões estabilizadas com polissorbato 80, quando submetidas à fase gástrica, sofrem uma modificação na interface devido à adsorção de íons hidróxido e ácidos graxos. Com a redução do pH na fase gástrica, a carga sobre os tensoativos diminui consideravelmente devido à

ionização dos grupos laterais e isso pode causar a desestabilização do sistema. Desta forma, a redução do diâmetro das partículas produzidas com 2,8% de OB pode ter sido causada por desestabilização do sistema na fase gástrica.

Já o aumento no diâmetro das partículas contendo 1,2% de óleo de babaçu pode ter sido causado por agregação na fase gástrica devido à coalescência e floculação. Vários mecanismos físico-químicos podem ter contribuído para essa agregação, como a presença de sais, que reduziriam a repulsão eletrostática entre as partículas e permitiu que essas ficassem mais próximas. A mudança no pH para ácido também pode ter contribuído para floculação (POOL et al., 2013; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013).

A partir do início da fase intestinal as partículas 2,0\_4,0 e 2,8\_4,0 apresentaram diâmetros significativamente menores que aquelas produzidas com a mesma composição lipídica e 2,0% de tensoativo. Essa diferença significativa foi mantida até o fim dos 120 minutos de ensaio da fase intestinal. Isso mostra que, para as partículas produzidas com maior quantidade de MCTs, o aumento da quantidade de tensoativo na formulação favoreceu a digestão destas partículas na fase intestinal, isso provavelmente se deve ao menor diâmetro inicial das partículas produzidas com uma maior porcentagem de tensoativo. Espera-se que a taxa de digestão dos lipídios aumente com a diminuição do diâmetro das partículas, uma vez que esta diminuição conduziria a um aumento da área de superfície exposta para a ação enzimática (MCCLEMENTS; LI, 2010). Além disso, estudos sugerem que a lipólise ocorre mais rapidamente para lipídios líquidos, o que justificaria a diminuição mais rápida do diâmetro das partículas produzidas com mais MCTs. Há uma série de possíveis razões para esta dificuldade de digestão dos lipídios sólidos, dentre elas, o estado físico dos lipídios, que pode ter influenciado a adsorção da lipase à interface, e as diferenças na organização espacial das moléculas de lipídios, que podem ter alterado a capacidade da lipase para realizar a hidrólise dos triacilgliceróis, isso porque a forma  $\beta$  dos cristais de triacilgliceróis é a forma polimórfica mais densa, com um empacotamento triclínico no qual e as cadeias adjacentes estão muito próximas, o que pode ter dificultado o acesso da lipase quando comparado com as moléculas no estado líquido (BONNAIRE et al., 2008).

O mesmo efeito não foi observado para as partículas com 1,2% de OB nas formulações, que mantiveram seus diâmetros próximos durante toda a fase

gástrica e a fase duodenal nos tempos de digestão analisados. Isso provavelmente se deve ao aumento da porcentagem de LCTs na formulação. Durante o processo de digestão, os ácidos graxos de cadeia média migram mais rapidamente para a fase aquosa do que os TAGs de cadeia longa. Entretanto, os ácidos graxos de cadeia longa tendem a se acumular na interface óleo-água e pode inibir a atividade da lipase, o que explicaria a menor variação do diâmetro em concentrações mais elevadas de LCTs (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013; DAHAN; HOFFMAN, 2008).

Analisando-se as formulações individualmente quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio durante o período de digestão *in vitro* pode ser observada uma semelhança no comportamento das partículas contendo 2,0% de tensoativo, que permaneceram com os diâmetros estatisticamente invariáveis durante os 180 minutos de digestão. Entretanto pode ser observada uma tendência de redução do diâmetro durante a fase intestinal.

As dispersões contendo 4,0% de tensoativo não apresentaram comportamento semelhante. As partículas da dispersão 1,2\_4,0 aumentaram significativamente seu diâmetro durante a fase gástrica, no entanto ao serem submetidas ao processo de digestão intestinal tiveram seu diâmetro reduzido novamente para próximo do inicial e este se manteve durante os 120 minutos posteriores. As partículas da dispersão 2,0\_4,0 tiveram seu diâmetro reduzido significativamente na fase gástrica e, ao serem submetidas à fase duodenal também apresentaram diâmetro inferior ao anterior e se manteve significativamente menor que o inicial até o fim dos ensaios. Já as partículas da dispersão 2,8\_4,0 também tiveram seu diâmetro reduzido significativamente na fase gástrica, entretanto ao entrarem em contato com as enzimas da fase intestinal e também com os sais de bile, aumentaram significativamente de diâmetro. No decorrer da digestão duodenal, a partir de 60 minutos as partículas novamente reduziram de diâmetro. Estes resultados também mostraram que não houve relação da quantidade de MCTs na formulação com o comportamento das partículas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio durante os ensaios de digestibilidade *in vitro* uma vez que as partículas produzidas com uma mesma quantidade de OB apresentaram comportamentos distintos durante os ensaios.

O potencial zeta também foi analisado nos mesmos tempos que o diâmetro hidrodinâmico médio e os resultados das médias, desvios padrões e resultados da análise estatística estão representados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Resultados de potencial zeta para ensaios de digestibilidade *in vitro* simulada das micropartículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina.

Formulação	Potencial Zeta (mV)				
	Fase gástrica		Fase intestinal		
	0 min	60 min	0 min	60 min	120 min
1,2_4,0	-21,6±6,8 <sup>aA</sup>	-15,0±1,3 <sup>aA</sup>	-44,7±11,3 <sup>aB</sup>	-59,4±6,2 <sup>abBC</sup>	-66,1±6,6 <sup>aC</sup>
1,2_2,0	-24,6±3,6 <sup>abAB</sup>	-22,2±6,9 <sup>aA</sup>	-49,3±5,7 <sup>aBC</sup>	-59,4±14,5 <sup>abC</sup>	-56,5±12,7 <sup>aC</sup>
2,0_4,0	-31,3±1,4 <sup>abA</sup>	-15,3±2,9 <sup>aA</sup>	-55,1±8,6 <sup>aB</sup>	-67,8±7,2 <sup>bB</sup>	-66,5±10,3 <sup>aB</sup>
2,0_2,0	-33,6±2,4 <sup>bB</sup>	-22,7±2,7 <sup>aA</sup>	-42,5±3,4 <sup>aC</sup>	-46,5±4,3 <sup>abC</sup>	-49,8±0,8 <sup>aC</sup>
2,8_4,0	-30,2±6,4 <sup>abA</sup>	-22,1±7,0 <sup>aA</sup>	-50,7±2,6 <sup>aB</sup>	-64,2±7,1 <sup>abBC</sup>	-70,3±3,9 <sup>aC</sup>
2,8_2,0	-20,9±1,3 <sup>aA</sup>	-13,1±2,4 <sup>aA</sup>	-36,8±8,0 <sup>aB</sup>	-45,1±2,0 <sup>abC</sup>	-55,2±8,4 <sup>aC</sup>

As letras minúsculas nas colunas indicam o resultado da análise estatística feita entre diferentes amostras em um mesmo tempo de digestão, enquanto que as letras maiúsculas nas linhas indicam se houve diferença significativa no tempo de digestão estudado para uma mesma amostra: letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias enquanto que letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre as médias analisadas (procedimento ANOVA, teste Tukey, ( $\alpha=0,05$ )).

As medições de potencial zeta foram realizadas a fim de avaliar as mudanças na composição interfacial das partículas durante os ensaios de digestibilidade *in vitro*. Como pode ser observado, o comportamento do potencial zeta durante as etapas de digestibilidade *in vitro* para todas as formulações foi o mesmo. Inicialmente, antes das amostras serem submetidas aos ensaios de digestibilidade *in vitro* os valores de potencial zeta mantiveram-se entre -20 e -34 mV. Após os 60 minutos da fase gástrica houve uma tendência de aumento destes valores (-13 a -23 mV), todavia o resultado da análise estatística mostra que este aumento não foi significativo. Imediatamente após iniciada a fase intestinal, os potenciais zeta das dispersões foram monitorados e apresentaram uma redução significativa (-36 a -55 mV). À medida que as partículas foram mantidas por mais tempo em contato com os fluidos intestinais simulados, houve uma redução contínua e significativa dos valores do potencial zeta, até que ao final dos 180 minutos de ensaio estes valores permaneceram na faixa de -49 a -71 mV.

É provável que a fase gástrica tenha levado a uma mudança drástica na carga devido ao pH ácido do meio gástrico. Após o ajuste do pH para 6,5 na fase duodenal, resultou numa diminuição significativa no valor potencial zeta. Estas mudanças no potencial zeta ao longo do tempo podem ser atribuídas às mudanças

na composição da camada interfacial. Os resultados sugerem que os sais de bile, que possuem elevada afinidade pela interface óleo-água, foram capazes de adsorver rapidamente na interface, provavelmente deslocando alguns dos compostos tensoativos originalmente presentes (POOL et al., 2013; YANG; MCCLEMENTS, 2013; NIK et al., 2011; NIK; CORREDIG; WRIGHT, 2010; HUR et al., 2009).

Por sua vez, as Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 mostram as imagens obtidas por microscopia ótica das diferentes formulações em diferentes momentos dos ensaios de digestibilidade *in vitro*. Observa-se nas imagens (a) e (d) a forma inicial das partículas aparentemente esféricas e em grande número. As imagens (b) e (e) ilustram a aparência das partículas após serem submetidas aos 60 minutos da fase gástrica.

Durante a fase gástrica nota-se algumas diferenças entre as partículas. Nesta fase é esperada pouca ou nenhuma quebra das moléculas lipídicas devido a não haverem lipases no meio, capazes de catalisar as reações de quebra destas moléculas e consequentemente liberar ácidos graxos. Este fenômeno é nitidamente observado nas formulações com 1,2 e 2,0% de OB no qual se observa apenas um espaçamento entre as partículas causado pela diluição dos sistemas no fluido gástrico simulado. O abaixamento do pH para estas partículas não causou alterações significativas nas respectivas estruturas. Geralmente, uma menor alteração na estrutura de emulsões e dispersões é observada quando há a utilização de tensoativos não-iônicos como os polissorbatos. A exposição destas emulsões ao fluido gástrico simulado geralmente não resulta em alterações visuais na estrutura das partículas, pois estes tensoativos são altamente estáveis em ambientes ácidos, devido à repulsão causada pelo grupo polioxietileno (GOLDING et al., 2011). Entretanto, com o aumento de MCTs nas formulações, nota-se uma formação maior de agregados após a fase gástrica, o que é indicativo de desestabilização do sistema (MCCLEMENTS, 2013; POOL et al., 2013; NIK; WRIGHT; CORREDIG, 2011).

Entretanto, diferentemente do observado na fase gástrica, as imagens (c) e (f) das Figuras de 5.8 a 5.10 mostram que houve a desestruturação das partículas pelo desaparecimento das formas esféricas, além da formação de novos agregados. Estes agregados possivelmente são sais de bile que não foram completamente solubilizados no quimo ou produtos da coalescência das partículas

(MCCLEMENTS, 2013; NIK; WRIGHT; CORREGID, 2011). Com o aumento da quantidade de MCTs na formulação, observa-se uma maior ausência de resíduos após a fase intestinal. Esse fato já era esperado uma vez que a hidrólise dos MCTs é mais rápida e mais eficiente do que a dos LCTs (MARTEN; PFEUFFER; SCHREZENMEIR et al., 2006).

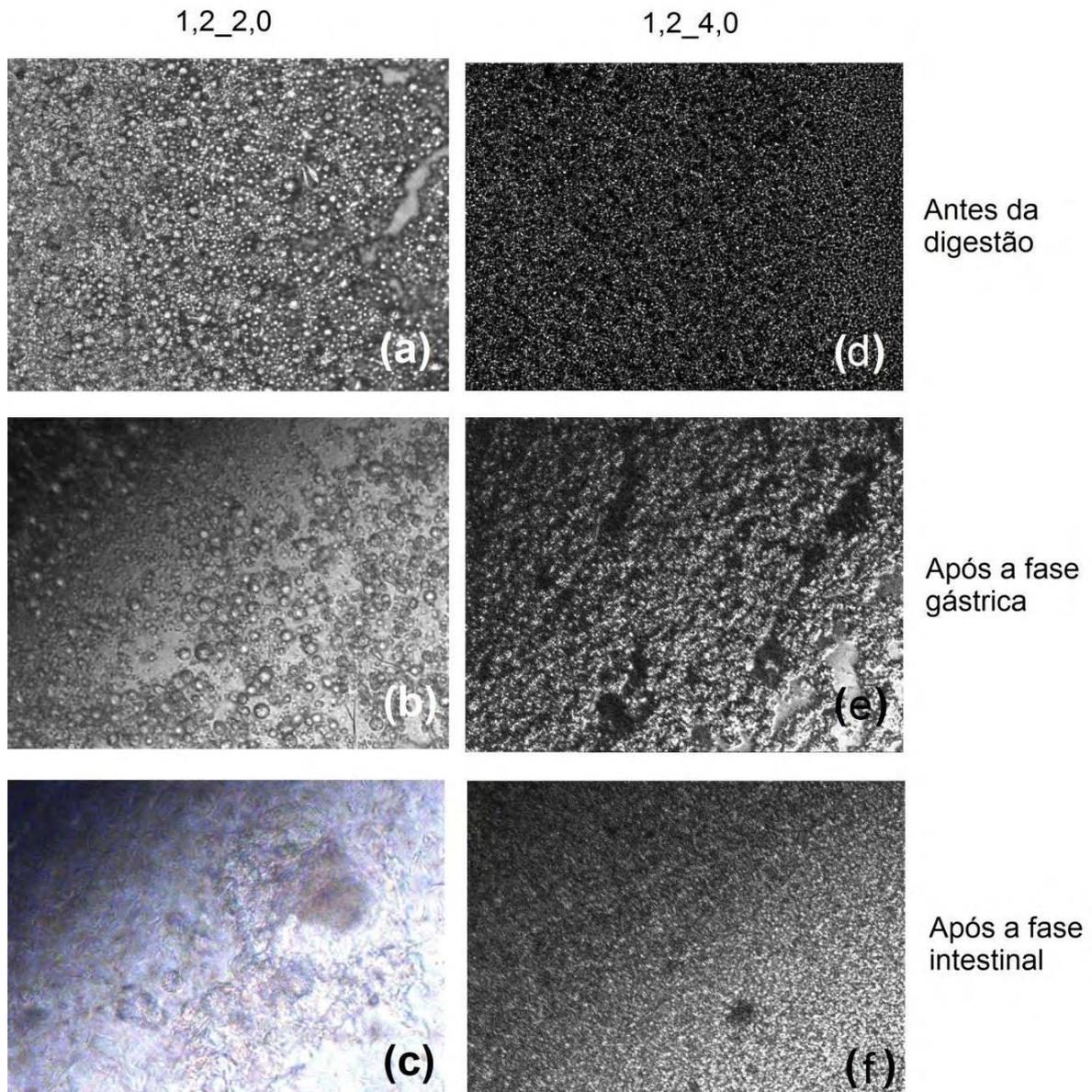


Figura 5.8. Imagens de microscopia ótica das fases da simulação da digestibilidade *in vitro* das partículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina contendo 1,2% de óleo de babaçu (Aumento de 100x): (a) partícula 1,2\_2,0 antes da digestão simulada; (b) partícula 1,2\_2,0 após a fase gástrica; (c) partícula 1,2\_2,0 após a fase intestinal; (d) partícula 1,2\_4,0 antes da digestão simulada; (e) partícula 1,2\_4,0 após a fase gástrica; (f) partícula 1,2\_4,0 após a fase intestinal.

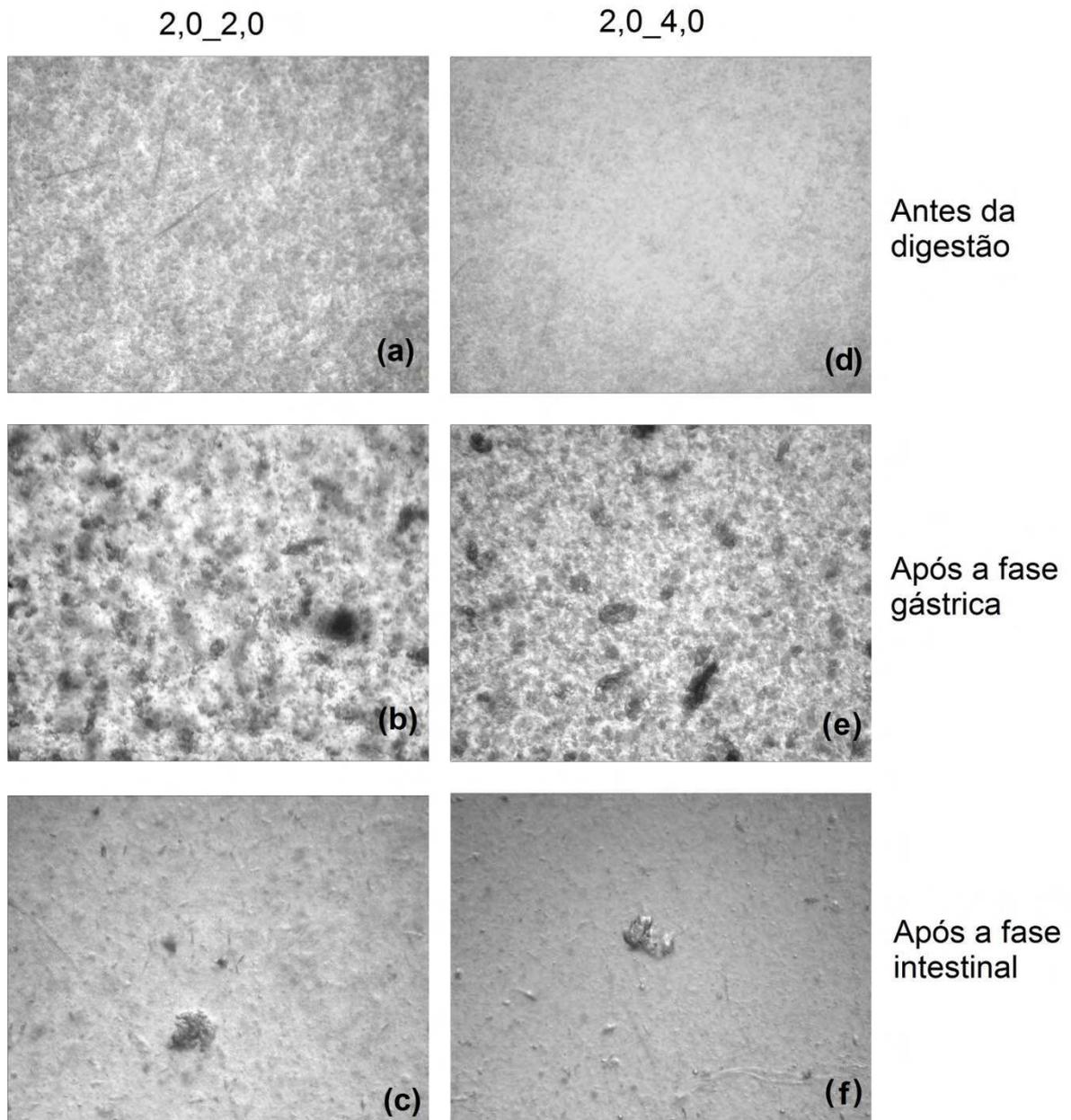


Figura 5.9. Imagens de microscopia ótica das fases da simulação da digestibilidade *in vitro* das partículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina contendo 2,0% de óleo de babaçu (Aumento de 100x): (a) partícula 2,0\_2,0 antes da digestão simulada; (b) partícula 2,0\_2,0 após a fase gástrica; (c) partícula 2,0\_2,0 após a fase intestinal; (d) partícula 2,0\_4,0 antes da digestão simulada; (e) partícula 2,0\_4,0 após a fase gástrica; (f) partícula 2,0\_4,0 após a fase intestinal.

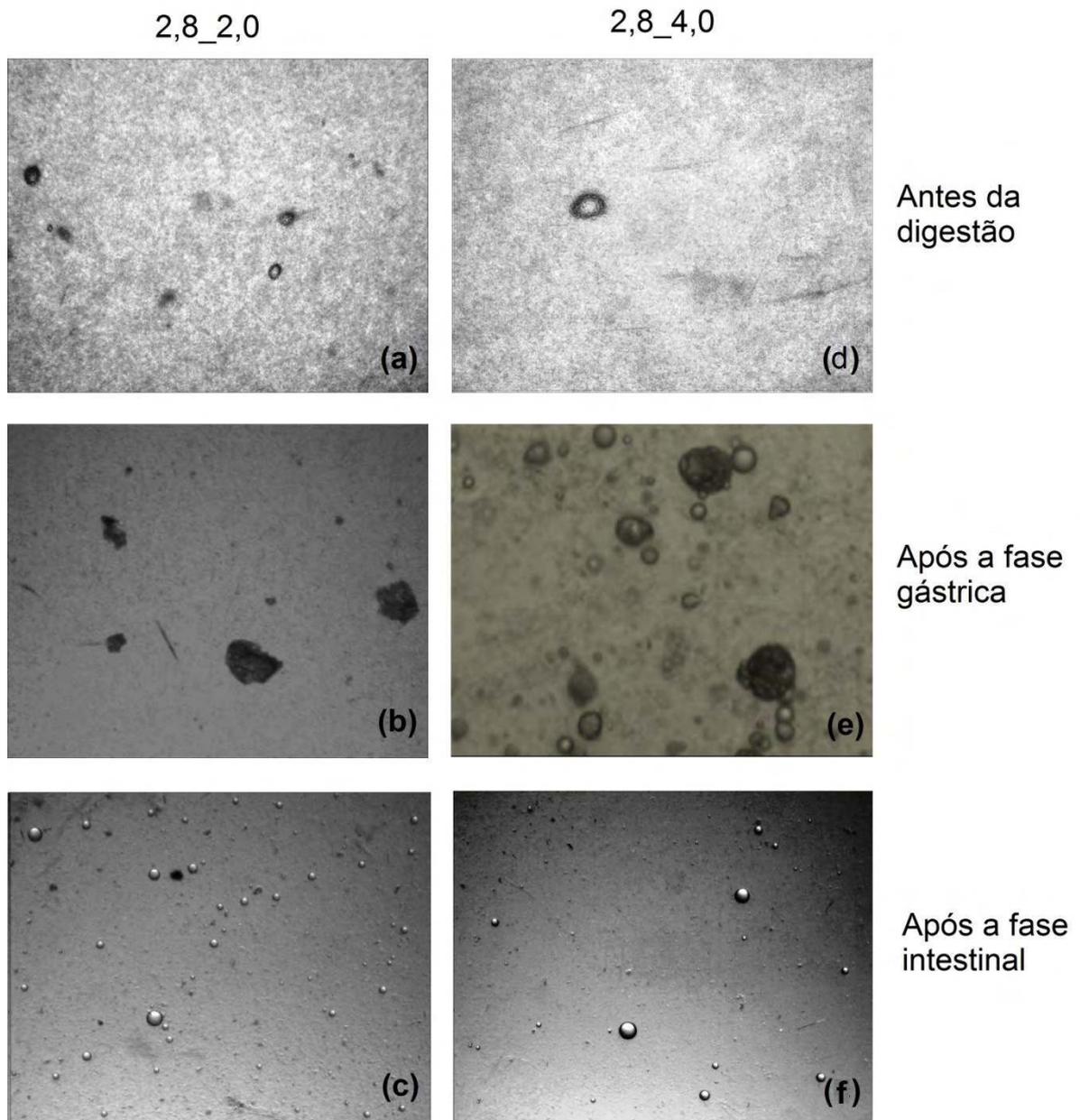


Figura 5.10. Imagens de microscopia ótica das fases da simulação da digestibilidade *in vitro* das partículas lipídicas sólidas encapsulando quercetina contendo 2,8% de óleo de babaçu (Aumento de 100x): (a) partícula 2,8\_2,0 antes da digestão simulada; (b) partícula 2,8\_2,0 após a fase gástrica; (c) partícula 2,8\_2,0 após a fase intestinal; (d) partícula 2,8\_4,0 antes da digestão simulada; (e) partícula 2,8\_4,0 após a fase gástrica; (f) partícula 2,8\_4,0 após a fase intestinal.

### **5.3.3. Liberação de ácidos graxos durante a digestão *in vitro* simulada e determinação da bioacessibilidade da quercetina encapsulada**

Modelos de digestão *in vitro* estão sendo cada vez mais utilizadas como ferramentas para facilitar a avaliação de sistemas de lipídicos de microencapsulação. Os modelos mantêm a temperatura de digestão controlada (37°C) através de sistemas de aquecimento e há a homogeneização contínua dos fluidos que simulam o intestino com as formulações à base de lipídios. A digestão é iniciada pela adição de lipase e co-lipase esta resulta na libertação de ácidos graxos, que por sua vez provocam uma redução no pH. Essa redução é quantificada por um eletrodo que é acoplado a um controlador, que dosa automaticamente os ácidos graxos livres pela adição de uma quantidade equimolar de NaOH. Este sistema mantém o pH em um ponto determinado e facilita a quantificação da extensão da digestão através da quantificação da taxa de adição de NaOH e da reação estequiométrica entre ácidos graxos e NaOH (PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007).

Desta forma, durante a fase intestinal, foi utilizado o modelo do tipo pH-stat para quantificação da extensão da lipólise e acompanhamento das modificações geradas no pH. Assim, através do monitoramento do pH, foi notado uma semelhança no comportamento das formulações na fase intestinal. Inicialmente, após a adição das enzimas e do extrato de bile, os valores iniciais variaram de 6,4 a 6,7. Após a adição das enzimas e do extrato de bile ao quimo proveniente da fase gástrica, a função pH-stat do titulador automático foi iniciada e o pH e o volume dosado de NaOH 1M foram monitorados. Os resultados do monitoramento do pH são mostrados na Figura 5.12. Como pode ser observado, as diferentes formulações apresentaram o mesmo comportamento em relação ao perfil de variação de pH durante a fase intestinal e o mesmo foi observado nos gráficos que representam a extensão da lipólise (Figura 5.13).

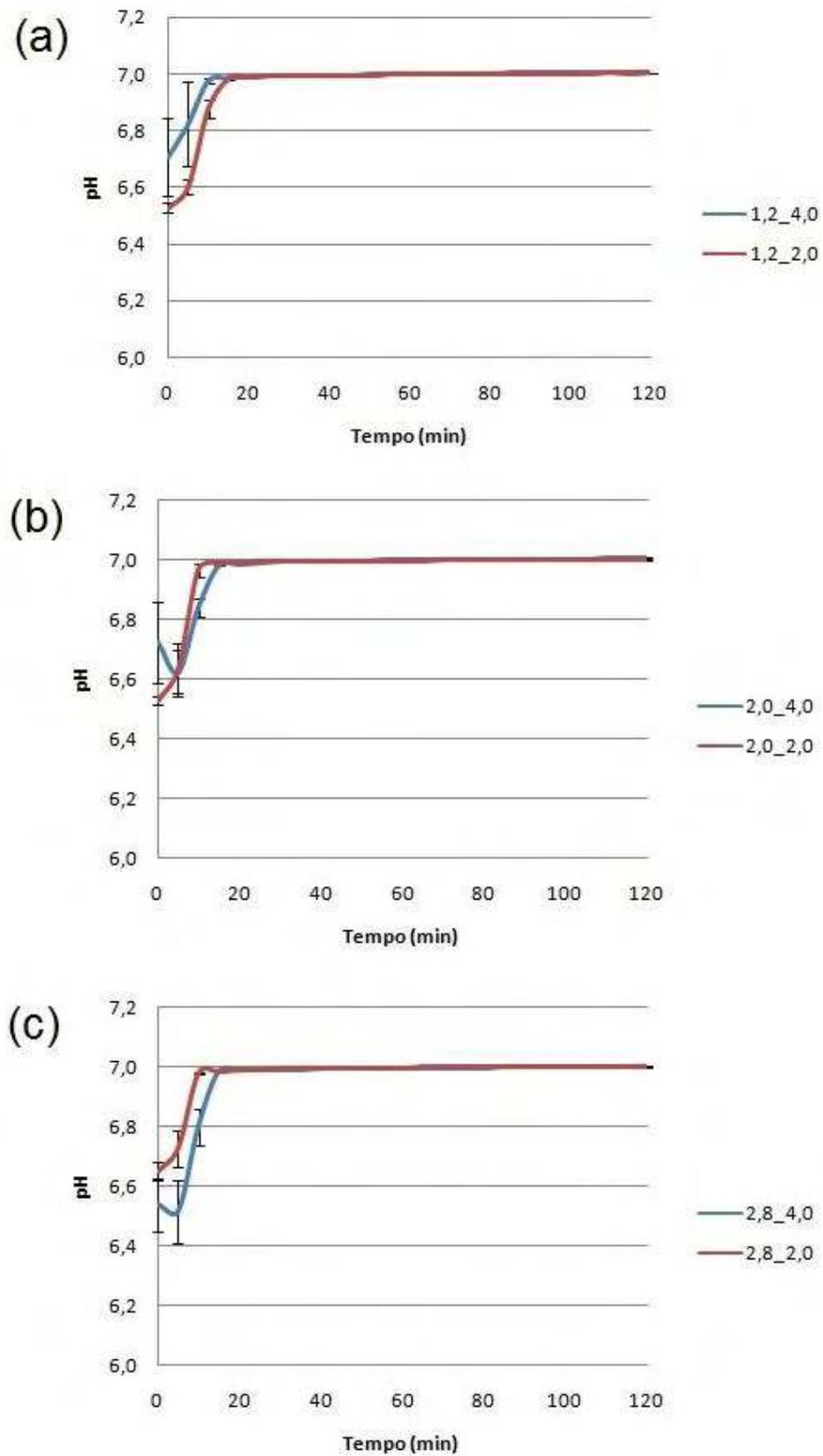


Figura 5.11. Perfis de variação do pH durante a fase intestinal dos ensaios de digestibilidade *in vitro*: (a) 1,2% de óleo de babaçu; (b) 2,0% de óleo de babaçu; (c) 2,8% de óleo de babaçu.

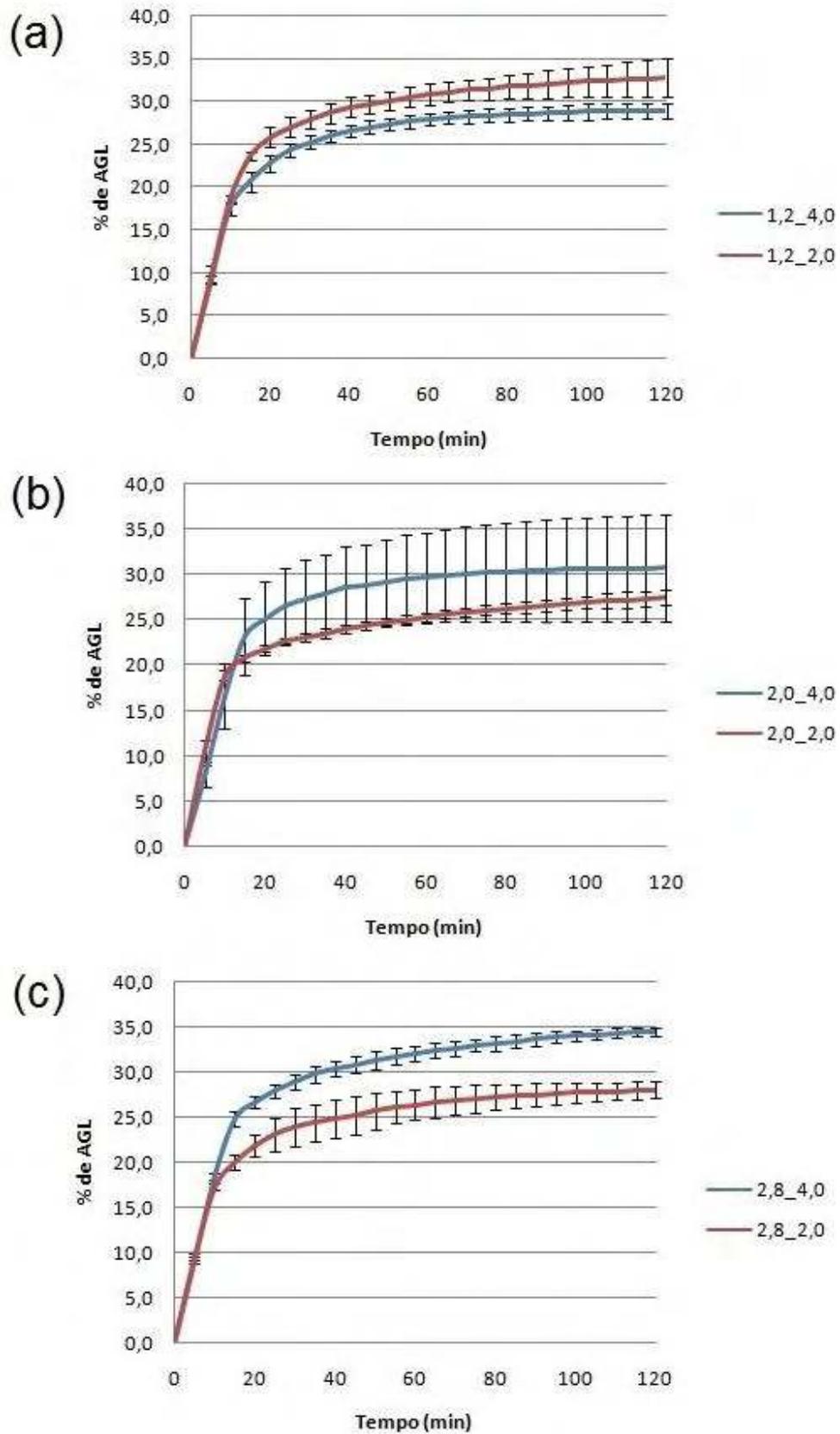


Figura 5.12. Perfis de liberação de ácidos graxos durante a fase duodenal dos ensaios de digestibilidade *in vitro*: (a) 1,2% de óleo de babaçu; (b) 2,0% de óleo de babaçu; (c) 2,8% de óleo de babaçu.

Na presença dos sais de bile e das enzimas foi observado um aumento rápido na quantidade de ácidos graxos liberados nos primeiros 15 minutos de ensaio da fase intestinal. No entanto, a taxa de formação do produto diminui consideravelmente após esse período. Isso acontece porque inicialmente a interface é facilmente acessível para as enzimas, no entanto, a saturação da interface óleo-água com os sais de bile, juntamente com a geração de produtos da lipólise, reduzem o acesso da enzima à interface. Estes resultados estão de acordo com a literatura (POOL et al., 2013; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013; NIK; WRIGHT et al., 2011a; MCCLEMENTS; LI, 2010).

A liberação mais acentuada de ácidos graxos nos primeiros 15 minutos de ensaio foi observada para todas as formulações e representam cerca de 20% dos ácidos graxos totais. Os valores finais de liberação de ácidos graxos são apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10. Resultados médios de liberação de ácidos graxos e resultados da análise estatística.

Formulação	%AGL*
1,2_4,0	28,9±1,0 <sup>a</sup>
1,2_2,0	32,8±2,2 <sup>a</sup>
2,0_4,0	30,8±5,9 <sup>a</sup>
2,0_2,0	27,5±0,9 <sup>a</sup>
2,8_4,0	34,5±0,4 <sup>a</sup>
2,8_2,0	28,0±0,9 <sup>a</sup>

\*As letras indicam se houve diferença significativa entre os valores obtidos de liberação de ácidos graxos entre diferentes amostras: letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias enquanto que letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre as médias analisadas (procedimento ANOVA, teste Tukey, ( $\alpha=0,05$ )).

É importante mencionar que ao final do tempo de digestão intestinal utilizado, a taxa de dosagem de NaOH não havia chegado a zero, e tal fato indica que a totalidade de ácidos graxos ainda não haviam sido liberados.

O resultado da análise estatística para os dados de liberação de ácidos graxos mostrou que não houve diferença significativa entre as diferentes formulações para este fator. Os valores indicam a liberação de aproximadamente 30% de ácidos graxos para todas as formulações e, portanto, tanto o aumento da concentração de MCTs quanto o aumento da concentração de tensoativo nas formulações não alterou a porcentagem de ácidos graxos liberados. Estes

resultados concordam com a literatura de digestibilidade de partículas lipídicas sólidas (SILVA et al., 2014; BONNAIRE et al., 2008) e mostram também que não há diferenças de liberação em relação a diâmetros de partículas menores, uma vez que os resultados obtidos por Bonnaire et al. (2008) foram muito próximos aos obtidos neste trabalho.

Finalmente, foi quantificada a bioacessibilidade da quercetina através da medição da concentração de quercetina na fase micelar recolhida ao final da digestão intestinal simulada. Os resultados são mostrados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Resultados de bioacessibilidade da quercetina microencapsulada em partículas lipídicas sólidas contendo OB.

Formulação	Bioacessibilidade (%)
1,2_4,0	52,6±5,3 <sup>ab</sup>
1,2_2,0	47,0±10,2 <sup>b</sup>
2,0_4,0	54,9±6,9 <sup>ab</sup>
2,0_2,0	60,1±12,0 <sup>ab</sup>
2,8_4,0	53,7±1,6 <sup>ab</sup>
2,8_2,0	69,1±5,9 <sup>a</sup>

As letras indicam o resultado da análise estatística feita entre os resultados para as diferentes formulações: letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as médias enquanto que letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre as médias das respectivas formulações (procedimento ANOVA, teste Tukey, ( $\alpha=0,05$ )).

Da mesma forma que para as análises de liberação de ácidos graxos, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa para a bioacessibilidade entre as amostras produzidas com a mesma concentração de OB, mas diferentes porcentagens de tensoativo, evidenciando que a quantidade de tensoativo na formulação não gerou alterações na biodisponibilidade da quercetina.

Entretanto, sob o ponto de vista da concentração de MCTs nas formulações, pode ser observado que a formulação 2,8\_2,0 apresentou valores significativamente mais altos de bioacessibilidade quando comparadas com aquelas formulações contendo 2,0% de tensoativo, porém menores concentrações de OB. O mesmo não foi observado para as formulações contendo 4,0% de tensoativo, que não apresentaram diferenças significativas.

Assim, o dado que indica 70% de bioacessibilidade de quercetina para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com 2,8% de OB e 2,0% de tensoativo

pode ser uma evidência de que, dependendo da concentração de tensoativo na formulação, o aumento da quantidade de MCTs pode melhorar a bioacessibilidade da quercetina, conforme descrito na literatura (SILVA et al., 2014; AHMED et al., 2012).

Xu et al. (2014) estudaram a bioacessibilidade de quercetina em nanoemulsões baseadas em pseudo-organelas produzidas com MCT e Tween 20 e obteve valores de bioacessibilidade de cerca de 50% para partículas com diâmetro inicial de 180 nm.

Por sua vez, Pool et al. (2013) obtiveram resultados que indicam o aumento da bioacessibilidade da quercetina através da encapsulação deste bioativo em nanoemulsões com partículas de 200 nm de diâmetro médio. Foram atingidos valores de cerca de 53% de bioacessibilidade para estas partículas que foram produzidas com MCT (Miglyol 812®),  $\beta$ -lactoglobulina como tensoativo, e concentrações da ordem de  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  de quercetina encapsulada.

Em outro estudo realizado por Pool et al. (2012), foram produzidas nanopartículas poliméricas para encapsulação da quercetina com aproximadamente 370 nm. Tal sistema conseguiu realizar a liberação de 22% da quercetina encapsulada na fase intestinal simulada.

Finalmente, Aditya et al. (2014) realizaram um estudo comparativo de bioacessibilidade da quercetina para nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados e nanoemulsões. Os valores máximos foram obtidos para os nanocarreadores lipídicos e nanoemulsões (60%), enquanto que 35% de bioacessibilidade foi obtido para as partículas lipídicas sólidas e 7% para uma solução de quercetina livre.

Dessa forma, analisando-se os dados obtidos é possível inferir que as micropartículas lipídicas produzidas com mais óleo de babaçu e menores concentrações de tensoativo foram as mais adequadas para aumentar a bioacessibilidade da quercetina e que os valores obtidos foram similares ou superiores àqueles obtidos em estudos realizados com nanopartículas lipídicas. Tal fato sugere que a bioacessibilidade deve estar mais relacionada com as características da matriz lipídica e com a interface da partícula do que com o fato de seu diâmetro estar na faixa nano ou submicrométrica, que é o caso deste trabalho de Mestrado. Vale ressaltar, entretanto, que as micropartículas produzidas no presente estudo foram obtidas utilizando-se somente uma etapa de ultra-

agitação, em um processo que não exige o emprego de homogeneizadores a alta pressão ou microfluidizadores. Para determinadas utilizações na área de alimentos, tal fator pode ser muito interessante, pois o custo de produção é reduzido, e o efeito funcional da ingestão da quercetina em um alimento enriquecido com as micropartículas lipídicas pode ser o mesmo do que em um alimento enriquecido com nanopartículas lipídicas.

Os resultados obtidos provavelmente têm relação com o estado físico dos lipídios utilizados nas formulações, uma vez que nas análises de DSC foi observada uma redução da temperatura de fusão das micropartículas produzidas com mais OB. Como a temperatura corporal, assim como a utilizada nos ensaios de digestibilidade *in vitro*, é próxima a 37°C, é provável que o aumento da concentração de OB nas formulações contendo 2,0% de tensoativo tenha favorecido a formação de uma matriz lipídica mais líquida, o que favoreceu a lipólise, e conseqüentemente gerou um aumento na bioacessibilidade.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho de Mestrado permitiram concluir que:

- Em relação à eficiência de encapsulação e estabilidade dos sistemas de microencapsulação estudados:

(i) As dispersões produzidas com menos de 2,0% de tensoativo não foram estáveis;

(ii) As partículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de babaçu e triestearina produzidas com mais de 2,0% de tensoativo foram capazes de encapsular 100% da quercetina inserida nas formulações;

(iii) Para as partículas contendo 4,0% de tensoativo, o aumento da concentração de óleo de babaçu reduziu a capacidade de preservação da quercetina;

(iv) Concentrações acima de 2,0% de tensoativo não tiveram influência significativa na capacidade de preservação da quercetina encapsulada;

(v) O aumento da concentração de tensoativo nas formulações gera uma redução no diâmetro médio das partículas;

(vi) O aumento da concentração de óleo de babaçu nas formulações reduz o diâmetro médio das partículas;

(vii) Os resultados de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e distribuição de tamanho de partícula indicam uma heterogeneidade do sistema produzido;

(viii) Os resultados de calorimetria diferencial de varredura (DSC) indicam que há uma heterogeneidade dentro da matriz lipídica, o que é favorável para encapsulação de bioativos hidrofóbicos;

(ix) Os resultados de estabilidade quanto ao diâmetro médio, potencial zeta e quantificação de quercetina encapsulada indicam que todos os sistemas produzidos com mais de 2,0% de tensoativo ficaram estáveis durante 30 dias de armazenamento, independente da concentração de óleo de babaçu na formulação, indicando que estes sistemas são adequados para preservação da bioatividade da quercetina;

- Em relação aos estudos de digestibilidade e bioacessibilidade:

(i) Houve diferenças significativas entre as formulações durante a fase gástrica nos resultados de diâmetro médio e microscopia óptica, evidenciando que a concentração de óleo de babaçu nas formulações pode ter influenciado a estabilidade das partículas em meio ácido;

(ii) Para as partículas produzidas com maior quantidade de MCTs, o aumento da quantidade de tensoativo na formulação favoreceu a digestão destas partículas na fase intestinal;

(iii) Foi obtido aproximadamente 30% de ácidos graxos liberados para todas as formulações e, portanto, esta metodologia de determinação da extensão da lipólise pode não ser a mais adequada;

(iv) A formulação 2,8\_2,0 apresentou valores significativamente mais altos de bioacessibilidade;

(v) Para as formulações contendo 4,0% de tensoativo, a porcentagem de MCTs não interfere na bioacessibilidade da quercetina, ao contrário das formulações contendo 2,0% de tensoativo, nas quais a concentração de óleo de babaçu afetou significativamente os valores obtidos.

Como conclusão global do trabalho, pode-se afirmar que a encapsulação da quercetina em micropartículas lipídicas sólidas foi satisfatória e que a inclusão de triacilgliceróis de cadeia média nas formulações pode favorecer o aumento da bioacessibilidade deste bioativo, dependendo da composição da interface das partículas produzidas.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados experimentais obtidos durante este trabalho de Mestrado, apresenta-se a seguir algumas sugestões para trabalhos futuros:

- (i) Realizar análises de microscopia de fluorescência para determinação da localização da quercetina nas partículas;
- (ii) Avaliar a digestibilidade dos sistemas aqui estudados em métodos *in vitro* dinâmicos;
- (iii) Avaliar se a adição de co-lipase na fase intestinal aumentaria a liberação de ácidos graxos livres, e a bioacessibilidade;
- (iv) Investigar o comportamento reológico que ocorre com os sistemas variando-se a concentração de quercetina nas formulações;
- (v) Incorporar os sistemas produzidos em algum sistema alimentício e avaliar a estabilidade, digestibilidade e bioacessibilidade da quercetina além das propriedades sensoriais do produto final.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITYA, N. P. et al. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 59, n. 1, p. 115-121, 2014.

AHMED, K. et. al, Nanoemulsion and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **FoodChemistry**,v. 132,p. 799-807, 2012.

AWAD, T. S. et al. A critical study of novel physically structured lipid matrices composed of homolipid from *Capra hircus* and theobroma oil. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam,v.322, p. 67-78, 2006.

BEARE-ROGERS, J. (Ed.). **Dietary fat requirements in health and development**. United States of America: Amer Oil Chemists Society, 1988. 87p .

BOISEN, S.; EGGUM, B. O. Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 4, p. 141-162, 1991.

BONNAIRE, L., et al. Influence of lipid physical state on the *in vitro* digestibility of emulsified lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3791–3797, 2008.

BRANDON, E. F. A. et al. Consumer product in vitro digestion model: bioaccessibility of contaminant and its application in risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Maryland Heights, v. 44, n. 2, p. 161-171, 2006.

BUNJES, H.;KOCH, M. H. J.;WESTESEN, K. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hoboken, v. 92, n. 7, p. 1509-20,2003.

BUNJES, H.;UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 59, n. 6, p. 379-402, 2007.

CHM, V.; VAN DE KAMP, E.; CJM, R. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. **RIVM report**, Netherlands, n. 320102002/2004,2004.87 p.

COORNACHIA, L.; ROOS, Y.H. Stability of  $\beta$ -carotene in protein-stabilized oil-in-water delivery systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 7013-7020, 2011a.

CORNACCHIA, L.; ROOS, Y.H. State of dispersed lipid carrier and interface composition as determinants of beta-carotene stability in oil-in-water emulsions. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 76, p. C1211-C1218, 2011b.

DAHAN, A.; HOFFMAN, A. Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery system by an *in vitro* dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 1-10, 2008.

DAS, S. et al. Formulation design, preparation and physico-chemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 483-9, 2011.

DAS, S.;CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS Pharm SciTech**, New York, v. 12, n. 1, p. 62-76, 2011.

DORA, C. L. et al. Formulation study of quercetin-loaded lipid-based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. **Latin American Journal of Pharmacy**, Argentina, v. 30, n. 2, p. 286-296, 2011.

FATOUROS, D.G.; BERGENSTAHL, B.; MULLERTZ, A. Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during *in vitro* digestion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, p. 85-94, 2007.

FERREIRA, B. S.;FAZA, L. P.; LE HYARIC, M.A comparison of the physicochemical properties and fatty acid composition of indaiá (*Attalea dubia*) and Babassu (*Orbignya phalerata*) oils. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2012, art. 532374, 2012.

GHOSH, A. et al. Hepatoprotective and neuroprotective activity of liposomal quercetin in combating chronic arsenic induced oxidative damage in liver and brain of rats. **Drug Delivery**, v. 18, n. 6, p. 451-459, 2011.

GOKCE, E.H.; et al. Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 7, p. 1841-1850, 2012a.

GOKCE, E.H. et al. A comparative evaluation of coenzyme Q10-loaded liposomes and solid lipid nanoparticles as dermal antioxidant carriers. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 7, p. 5109–5117, 2012b.

GOLDING, M.; WOOSTER, T. J. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Kidlington, v. 15, n. 1-2, p. 90–101, 2010.

GOMES, G. V. L. et al. Characterization and shelf life of  $\beta$ -carotene loaded solid lipid microparticles produced with stearic acid and sunflower oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 663–671, 2013a.

GOMES, G. V. L. et al. Development of a lipid particle for beta-carotene encapsulation using a blend of tristearin and sunflower oil: choice of the lipid matrix and evaluation of the shelf life of dispersions. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 383-391, 2013b.

GRIFFIN, B.T.; O'DRISCOLL, C.M. A comparison of intestinal lymphatic transport and systemic bioavailability of saquinavir from three lipid-based formulations in the anaesthetised rat model **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 58, n. 7, p. 917-925, 2006.

GUMIERO, V. C.; ROCHA FILHO, P. A. Babassu nanoemulsions have physical and chemical stability. **Journal of Dispersion Science and Technology**, Philadelphia, v. 33, n. 11, p. 1569-1573, 2012.

HELGASON, T. et al. Impact of surfactant properties on oxidative stability of  $\beta$ -carotene encapsulated within solid lipid nanoparticles. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 8033–8040, 2009.

HEURTAULT, B. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283–4300, 2003.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B., Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 37, n.9-10, p. 937-942, 1999.

HORIBA Instruments, Inc. **A guidebook to particle size analysis**. Irvine, CA, USA. 2012. 30p.

HUNG, L. C. et al. An improved method for the preparations of nanostructured lipid carriers containing heat-sensitive bioactives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 87, p. 180-186, 2011.

HUR, S. J. et al. Impact of salt and lipid type on in vitro digestion of emulsified lipids. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 126, n. 4, p. 1559–64, 2011a.

HUR, S. J. et al. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 125, p. 1-12, 2011b.

HUR, S. J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, Amsterdam, v.114, p. 253-262, 2009.

JANNIN, V.; MUSAKHANIAN, J.; MARCHAUD, D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 60, p. 734-746, 2008.

JEONG, S.H.; PARK, J.H.; PARK, K. Formulation issues around lipid-based oral and parenteral drug delivery systems. In: WASAN, K.M. (Ed.) **Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery**. Hoboken: Wiley- Interscience, 2007.

KANADASWAMI, C. et al. The antitumor activities of flavonoids. **In Vivo**, Attiki, v. 19, p. 895-909, 2005.

KOSSENA, G. A. et al. Probing drug solubilization patterns in the gastrointestinal tract after administration of lipid-based delivery systems: a phase diagram approach. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 93, n. 2, p. 333-348, 2004.

LACATUSU, I. et al. Highly antioxidant carotene-lipid nanocarriers: synthesis and antibacterial activity. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 14, p. 902-917, 2012.

LAI, F. et al. *Artemisia arborescens* L. essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. **AAPS Pharmaceutics**, New York, v. 7, p. E1-E9, 2006.

LANDI-LIBRANDI, A. P. et al. Inhibitory activity of liposomal flavonoids during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immunocomplexes and phorbol ester. **Drug Delivery**, New York, v. 19, p. 177-187, 2012.

LEONARDUZZI, G. et al. Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids. **Current Medicinal Chemistry**, Bussum, v. 17, p. 74-95, 2010.

LESME, U.; MCCLEMENTS, D. J. Structure and function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 20, n. 10, p. 448-457, 2009.

LI, H. et al. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 133, n. 3, p. 238-244, 2009.

LI, H. et al. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 133, p. 238-244, 2009.

LI, Y. et al. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on Polymethoxyflavone crystallization. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 517-528, 2012.

LIU, C.H.; WU, C.T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 353, p. 149-156, 2010.

MALAKI-NIK, A.; LANGMAID, S.; WRIGTH, A.J. Non-ionic surfactant and interfacial structure impact crystallinity and stability of  $\beta$ -carotene loaded lipid nanodispersions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 4126-4135, 2012.

MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J. Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, n. 11, p. 1374-1382, 2006.

MCCLEMENTS, D. J. Colloidal basis of emulsion color. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, Kidlington, v. 7, n. 5-6, p. 451-455, 2002.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; PARK, Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 48-67, 2009.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsion**: principles, practice, and techniques. Boca Raton: CRC Press, 2005.

MCCLEMENTS, D.J. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 174, p. 1-30, 2012.

MCCLEMENTS, D.J.; LI, Y., Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 159, p. 213-228, 2010.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v. 5, p. 1113–1124, 2014.

MÜLLER, R.H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 50, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 242, n. 1-2, p.121-128, 2002.

NIK, A.M.; CORREDIG, M.; WRIGHT, A.J. Changes in WPI-stabilized emulsion interfacial properties in relation to lipolysis and  $\beta$ -carotene transfer during exposure to simulated gastric-duodenal fluids of variable composition. **Food Digestion**, New York, v. 1, n. 1-2, p. 14-27, 2010.

NIK, A.M.; WRIGHT, A.J. Micellization of beta-carotene from soy-protein stabilized oil-in-water emulsions under *in vitro* conditions of lipolysis. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Heidelberg, v. 88, n. 9, p. 1397-1407, 2011a.

NIK, A.M.; WRIGHT, A.J.; CORREDIG, M. Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different *in vitro* digestion models. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 83, p. 321-330, 2011b.

OOMEN, A. G. et al. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 44, n. 3, p. 281-7, 2003.

PATEL, M.R.; SAN MARTIN-GONZALEZ, M.F. Characterization of ergocalciferol loaded solid lipid nanoparticle. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 71, p. N8-N13, 2012.

PESSOA, R. S. et al. Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function. **Drug Design, Development and Therapy**, Macclesfield, v. 9, p. 21-31, 2015.

PHAN, S. et al. Structural aspects of digestion of medium chain triglycerides studied in real time using sSAXS and Cryo-TEM. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 30, n. 12, p. 2088-3100, 2013.

PISKULA, M.K.; MURATA, K.; TERAOKA, J. Bioavailability of flavonols and flavones. In: CROZIER, A. (Ed.). **Flavonoids and related compounds: bioavailability and function**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 93-107.

POOL, H. et al. Polymeric nanoparticles as oral delivery systems for encapsulation and release of polyphenolic compounds: impact on quercetin antioxidant activity & bioaccessibility. **Food Biophysics**, New York, v. 7, n. 3, p. 276-288, 2012.

POOL, H. et al. Encapsulation and release of hydrophobic bioactive components in nanoemulsion-based delivery systems: impact of physical form on quercetin bioaccessibility. **Food and Function**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 162-74, 2013.

PORTER, C. J. H. et al. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 60, p. 673-691, 2008.

PORTER, C.J.H.; TREVASKIS, N.L.; CHARMAN, W.N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 6, n. 3, p. 231-248, 2007.

POUTON, C. W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 29, n. 3-4, p. 278–87, 2006.

POUTON, C. W. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 11, suppl. 2, p. S93, 2000.

POUTON, C. W.; PORTER, C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 60, n. 6, p. 625–37, 2008.

PROMBUTARA, P.; et al. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. **Food Control**, Kidlington, v. 24, p.184-190, 2012.

QI, C. et al. Preparation and characterization of catalase-loaded solid lipid nanoparticles based on soybean phosphatidylcholine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 92, p. 787–793, 2012.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.p. 51-64.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Modulating  $\beta$ -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 139, n. 1-4, p. 878-884, 2013.

SCALIA, S.; MEZZENA, M. Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo- and chemical-stability. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 49, p. 90–94, 2009.

SEVERINO, P. et al. Current state-of-art and new trends on lipid nanoparticles (SLN and NLC) for oral drug delivery. **Journal of Drug Delivery**, Cairo, v. 2012, art.750891,2012.

SEVERINO, P. et al. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, Amsterdam, v. 86, p. 125-130, 2011.

SHUKAT, R.; BOURGAUX, C.; RELKIN, P. Crystallisation behaviour of palm oil nanoemulsions carrying vitamin E. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapest, v. 108, p. 153–161, 2012.

SHUKAT, R.; RELKIN, P. Lipid nanoparticles as vitamin matrix carriers in liquid food systems: on the role of high-pressure homogenisation, droplet size and adsorbed materials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 86, p. 119-124, 2011.

SILVA, J. C. **Estabilidade físico-química e avaliação da digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

SILVA, J. C. et al. Characterization, physicochemical stability, and evaluation of in vitro digestibility of solid lipid microparticles produced with palm kernel oil and tristearin. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 3, p. 532–538, 2014.

SILVA, J.C.; PINHO, S.C. Viability of the microencapsulation of a casein hydrolysate in lipid microparticles of cupuacu butter and stearic acid. **International Journal of Food Studies**, Porto, v. 2, p. 48-59, 2013.

SOUTO, E. B. et al. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos de produção laboratorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011.

SOUZA, V. P. et al. Nanostructured systems containing babassu (*Orbignya speciosa*) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 8, p. 3129-3139, 2013.

TAN, Q. et al. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 6, p. 1621-1630, 2011.

TEJESWARI, N. et al. Based drug delivery system for enhancing oral bioavailability: a contemporary review. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, Kadapa, v. 5, n. 4, p. 2074-2082, 2014.

TROMBINO, S. et al. Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 72, p. 181–187, 2009.

VERSANTVOORT, C. H. M. et al. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 43, n. 1, p. 31-40, 2005.

WASAN, K. M. **Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery: Basic principles and biological examples**. Vancouver: Wiley-Interscience, 2007. 205 p.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

WONG, M.Y.; CHIU, G.N.C. Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model. **Nanomedicine**, New York, v. 7, n. 6, p. 834-840, 2011.

WU, T.H. et al. Preparation, physicochemical characterization and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 346, n. 1-2, p. 160-168, 2008.

XU, X. **Improve bioaccessibility of quercetin using pseudo-organogel based nanoemulsions**. 2014. 53 f. Thesis (Master's) –New Brunswick Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, 2014.

YANG, L. et al. Characterization of quercetin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. **Asian Journal of Chemistry**, Ghaziabad, v. 24, p. 3141-3144, 2012.

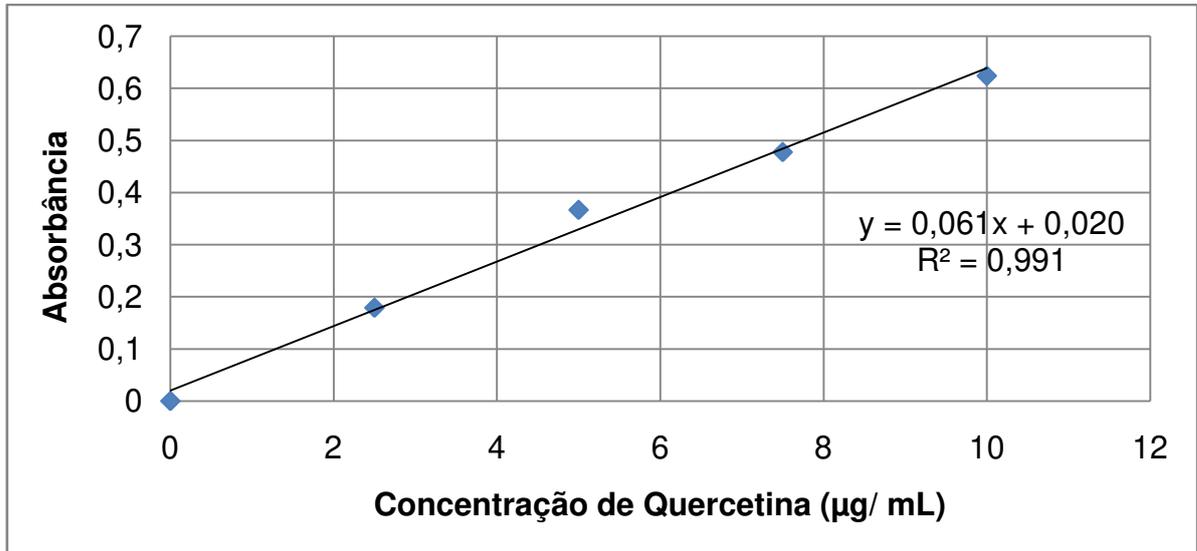
YANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified  $\alpha$ -tocopherol acetate. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 473–481, 2013.

YUAN, Z. P. et al. Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 12, p. 3193-3199, 2006.

ZHUANG, C. Y. et al. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 394, p. 179-185, 2010.

**ANEXO A**

Curva padrão para determinação da concentração de quercetina em etanol



**ANEXO B**

Curva padrão para determinação da concentração de quercetina em DMSO

